

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
"FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE  
XVIII CICLO**

**STUDIO STRUTTURALE DI COMPONENTI  
DI MEMBRANA DI BATTERI  
ESTREMOFILII**

**Relatore:**  
Prof. V. Piccialli

**Tutore:**  
Prof.<sup>ssa</sup> M. M. Corsaro

**Coordinatore:**  
Prof.<sup>ssa</sup> R. Lanzetta

**Candidato**  
Teresa Naldi

ANNO ACCADEMICO

2004-2005

# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	<b>3-7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>8-26</b>
1.1. I batteri	8
1.2. I batteri estremofili	12
1.3. I lipopolisaccaridi e la membrana esterna dei batteri Gram Negativi	14
1.4. Struttura generale dei lipopolisaccaridi	17
1.0. Batteri alofili e alcalofili: <i>Halomonas pantelleriensis</i>	21
1.6. <i>Escherichia coli</i> K12 e <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC 125	24
<b>2. METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI UN POLISACCARIDE</b>	<b>27-58</b>
2.1. Isolamento e purificazione	29
2.2. Identificazione del lipopolisaccaride	31
2.3. Idrolisi blanda di un LPS	32
2.4. Allontanamento degli acidi grassi da un LOS	33
2.5. Tecniche cromatografiche	34
2.5.1. Cromatografia liquida ad alta pressione	35
2.6. Analisi quali-quantitativa dei monosi	37
2.7. Determinazione della configurazione assoluta dei monosaccaridi	40
2.8. Determinazioni delle posizioni dei legami interglicosidici	41
2.9. Determinazione delle dimensioni dell'anello	46
2.10. Determinazione della configurazione dei centri anomerici	47
2.11. Determinazione della sequenza dei residui glicosidici	48
2.12. Metodi spettroscopici e spettrometrici	49
2.12.1. Risonanza magnetica nucleare (NMR)	49
2.12.1.2. Risonanza magnetica nucleare bidimensionale	53
2.12.2. Spettrometria di massa MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)	56

2.12.3. Spettrometria di massa con sorgente elettrospray (ESI-MS)	58
<b>3. PARTE SPERIMENTALE, ACQUISIZIONE DATI E DISCUSSIONE</b>	<b>58-107</b>
<i>HALOMONAS (DELEJA) PANTELLERIENSIS</i>	
3.1. Condizioni di crescita del batterio e procedure di estrazione del materiale lipopoli- e lipooligosaccaridico	58
3.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio deossicolato (DOC-PAGE)	61
3.3. Elettroforesi su gel di agarosio per acidi nucleici	65
3.4. Idrolisi enzimatica mediante nucleasi	66
3.5. Purificazione mediante cromatografia	69
3.6. Metil-glicosidi-acetilati-(MGA)	70
3.7. Ottenimento del materiale polisaccaridico	73
3.8. Alditoli Acetilati Parzialmente Metilati-(AAPM)	75
3.9. Determinazione della configurazione assoluta	79
3.10. Isolamento del 4-O-(carbossietil)-glucuronico	84
3.11. Spettroscopia di massa MALDI	77
3.12. Spettroscopia NMR della O-chain	85
<i>PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANKTIS TAC 125</i>	
3.13. Condizioni di crescita del batterio	91
3.14. Procedura di estrazione del LOS	91
3.15. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiodeossicolato (DOC-PAGE)	92
3.16. Analisi degli zuccheri e dei lipidi	93
3.17. Ottenimento della componente oligosaccaridica	95
3.18. Analisi di metilazione	98
3.19. Spettroscopia NMR	100
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>108-110</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>111-113</b>

## ABSTRACT

The topic of this Ph.D. thesis is the structural studies on lipooligosaccharides and lipopolysaccharides produced by two extremophiles Gram-negative bacteria: *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125's mutant and *Halomonas (Deleja) pantelleriensis*.

The term extremophiles is referred to microorganisms living in extreme environments, as high or low temperature, high pressure, unusual concentration of salts and unusual levels of pH, and developing a large ability to survive to a wide variety of environmental stress. They include thermophiles, halophiles, alkaliphiles, psychrophiles, etc. and currently found between the domains *Bacteria* and *Archaea* [1].

To survive in these harsh conditions extremophiles have developed several strategies that allow the microorganisms to thrive. These adaptative strategies also concern the bacteria outer membrane, a barrier regulating the exchanges with the environment. In such a context the lipopolysaccharides (LPSs), which are the main constituent of the outer leaflet of the outer membrane in Gram-negative bacteria, are thought to contribute to the restrictive membrane permeability properties [2].

The lipopolysaccharides are complex macromolecules constituted of three covalently linked regions, genetically and structurally distinct: the O-specific polysaccharide (*O*-chain, *O*-antigen), the core oligosaccharide and a glycolipid portion, termed lipid A, which anchors the molecule to the outer layer of bacterial outer membrane. Depending on the carbohydrate size, there exist two kinds of lipopolysaccharides, smooth- and rough-type (S-LPS and R-LPS). Both structures are built up of lipid A and core covalently bonded, but for smooth type LPS the core region is at its turn covalently linked to *O*-specific chain. Both forms are present in wild-type Gram negative bacteria, being core-lipid A moiety the minimum structural unit requested for the life of bacteria [3].

As for *Halomonas pantelleriensis* (*Hp*) [4] the cells were extracted by phenol/water method obtaining crude LPS from the aqueous phase. In order to eliminate nucleic acids this sample was treated with RNase since the presence of only RNA was established both by GC-MS analysis of sugars (ribose content) and by agarose gel

electrophoresis. As this treatment is not sufficient to completely eliminate nucleic acids the LPS fraction was submitted to hydrophobic chromatography on a Butyl Sepharose column.

The fraction eluted in absence of isopropanol showed, by GC-MS analysis of sugars, to still contain ribose, while containing a very low amount of LPS. The other, eluted with 40% of isopropanol, was completely devoid of ribose, therefore the structural analysis proceeded on this fraction. The DOC-PAGE of this fraction showed the typical ladder of LPS by comparison with LPS standard from *Escherichia coli*. Moreover the electrochromatographic profile suggested a semi-rough nature for the *Hp* LPS.

The fatty acids composition of LPS was determined by GC-MS analysis of the lipid methyl esters after treatment with 1M HCl/CH<sub>3</sub>OH and extraction with hexane. The GC column profile showed the presence of C12:0 and C12:0 (3-OH). The sugar analysis by GC-MS of acetylated methyl glycosides indicated, by comparison with standards, the presence of QuiNAc, Glc, GlcNAc, two different heptoses and traces of GlcA and Kdo. Moreover two signals unidentified were present. The fragmentation pattern in these spectra was very similar to that of uronic acids, but it was not easily interpretable. These sugars were identified by acetylated alditols after carbonyl reduction: one sugar is recognized, from its retention time, to be GalNAc, which derived from the galactosaminuronic acid (GalNAcA), the other sugar was recognized from the fragments analysis and from the comparison with pertinent EI-MS spectra. This was identified as a 4-*O*-(1-carboxyethyl)-hexose, which derived from the corresponding uronic acid.

The methylation analysis indicated the presence of 4-linked GlcA, 3-linked QuiNAc and 2-linked 4-*O*-(1-carboxyethyl)-uronic acid. No traces of GalNAcA could be found.

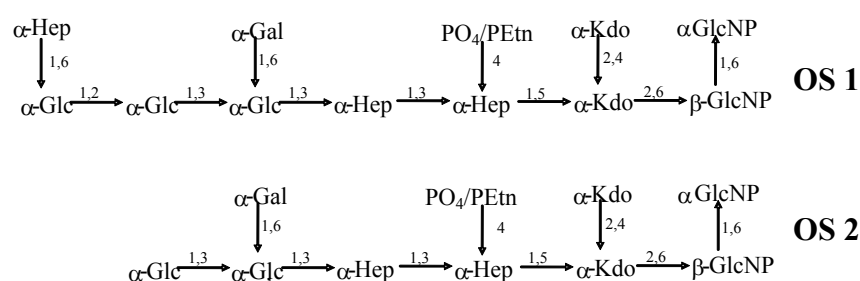
The mild hydrolysis of the LPS sample gave, as expected for a semi-rough bacterium, a very low content of *O*-chain and a much more abundant core fraction. The *O*-chain glycosyl composition confirmed the presence of all the sugars described above, included the heptoses which are characteristic of core fraction, suggesting the presence of only few repetitive units of *O*-chain. According to this result was the negative ion MALDI reflectron spectrum that showed signals for only four repetitive units.



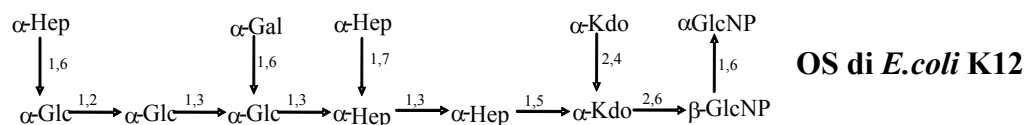
attributable to different length of the oligosaccharides and /or to the different number of phosphates.

The full assignment of NMR signals was obtained by DQF-COSY, TOCSY, ROESY,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC experiments. Finally phosphate groups were revealed by a  $^{31}\text{P}$  NMR experiment and assigned on the basis of  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ -HSQC. All sugars were present as pyranose rings, as indicated by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts and by methylation analysis. Anomeric configurations was assigned on the basis of  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts, and of  $^3J_{\text{H1,H2}}$  values determined from the DQF-COSY experiment.

For this core structure two main oligosaccharides were identified:



These structures were completely different from the core oligosaccharide of wild type [6], while they were very similar to the structure of *Escherichia coli* K12 [7]:



After studies of molecular biology it was confirmed that this bacterium was not a *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 mutant, but it is a mutant of *Escherichia Coli* K12, S17- $\lambda$ pir strain. Furthermore, these studies revealed that the gene *waaG*, encoding heptosyltransferase III, has got a mutation.

There are experimental obviousness that this bacterium presents inclusion bodies inside the cell owed to the improper folding of the membrane protein (Omp). It is well

known that the LPSs have an important role into the folding of these proteins [7] suggesting, thus, for our bacterium a correlation between the inclusion bodies and the structure of the LPSs.

At this moment we think to perform complementation experiments in order to obtain the LPS correct structure.

Our future project are to perform complementation experiments to obtain the LPS correct structure in order to verify the disappearance of inclusion bodies.

## REFERENCES

- 1) Woese et al. (1990), Herbert and Sharp (1992)
- 2) G.Aspinal in G. Aspinal (Ed), *The Polysaccharies*, (1983) **2**, Academic Press, New York.
- 3) U.Zahringer, B. Linder, E. T. Rietschel, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, (1994) **50**, 211-276.
- 4) I. Romano, B. Nicolaus, L. Lama, M.C. Manca, A. Gambacorta, *Sistem. Appl. Microbiol.* (1996) **19**, 326.
- 5) L.Birolò, M.L.Tutino, B.Fontanella, C.Gerday, K.Mainolfi, S.Pascarella, G.Sannita, F.Vinci & G.Marino, *Eur.J. Bioche.* (2000) **267**, 2790.
- 6) M.M. Corsaro, R. Lanzetta, E. Parrilli, M. Parrilli, M.L. Tutino *EurJ.Biochem.* (2001) **268**, 5092
- 7) S. Muller-Loennies, B.Lindner, H. Brade *J.Biol.Chem.* (2003) **278**, 34090-34101.

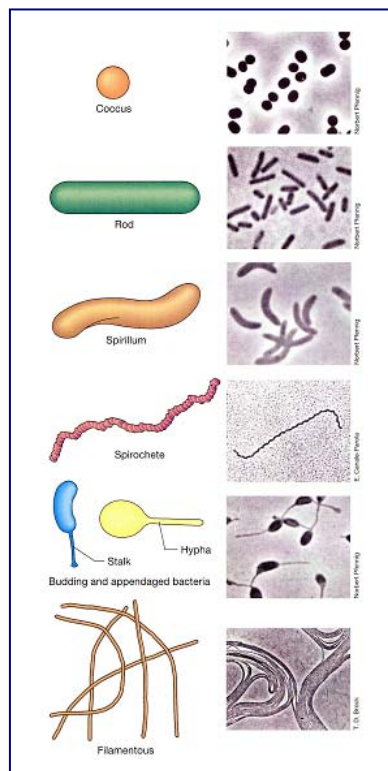


# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. I batteri

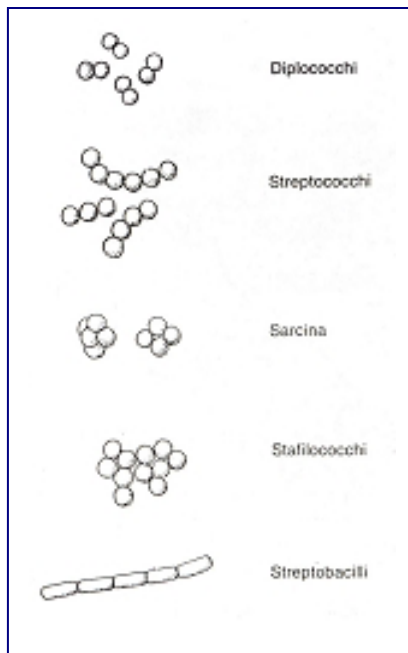
I batteri, a causa della loro rapida proliferazione e dell'azione biochimica che svolgono, rappresentano un gruppo notevolmente importante per il mondo vivente, difatti il loro studio costituisce materia di una scienza a sé: la *batteriologia*.

Tali microrganismi hanno una morfologia abbastanza semplice e ben definita; ritroviamo, infatti, forme diritte, a piccoli bastoni, forme ricurve a virgola, a mezza luna (*vibrioni e spirilli*), forme tondeggianti (*cocchi*):



**Figura 1:** Forme caratteristiche di cellule batteriche.

I batteri sono organismi unicellulari e si possono ritrovare sia come cellule singole che come aggregati di cellule; si riconoscono diversi tipi di aggregazione cellulare:



**Figura 2:** *Differenti tipi di aggregazioni cellulari nei batteri.*

La cellula batterica, circoscritta da una membrana più o meno spessa e mucillaginosa e da una sottostante parete cellulare con funzione protettiva, consta di una massa protoplasmatica poco differenziata in cui sono, però, presenti delle granulazioni contenenti proteine, grassi, glicogeno, acido ribonucleico e talvolta pigmenti idro o liposolubili. I batteri, inoltre, possono essere immobili o mobili, nel qual caso la membrana cellulare è provvista di uno o più flagelli.

L'eterogeneità dei batteri non si riscontra solo per la loro morfologia, ma anche rispetto alla fisiologia: esistono, infatti, specie che possono vivere sia in condizioni aerobiche sia anaerobiche.

Per quanto riguarda il nutrimento, i batteri sono generalmente eterotrofi, ossia metabolizzano solo sostanze organiche già sintetizzate (specie saprofiti e parassiti, obbligate e facoltative, specie simbiotici). Esistono, però, anche specie autotrofe, capaci, cioè, di sintetizzare le sostanze organiche necessarie al proprio metabolismo da fonti inorganiche (nitrobatteri, ferrobatteri, ecc.)

La loro riproduzione, generalmente, avviene per via asessuata, mediante scissione o mediante spore.

Il riconoscimento dei batteri si avvale essenzialmente di:

- ✦ *Caratteristiche morfologiche*, rilevabili al microscopio ottico;

- ✦ *Caratteristiche tintoriali*, evidenziabili con i normali metodi di colorazione tipo Gram, Ziehl, ecc.;
- ✦ *Esame delle colonie* sviluppatesi da mezzi colturali particolari;
- ✦ *Esame del potere antigene*;
- ✦ *Esame del potere patogeno*;

I batteri rivestono un'importanza fondamentale in natura: sono gli agenti delle fermentazioni e delle putrefazioni che scindono le sostanze organiche in composti inorganici, fissano i gas atmosferici, arricchiscono il suolo in azoto e forniscono ai vegetali una parte dei composti inorganici di cui hanno bisogno per il loro sviluppo.

Negli ultimi anni si sono sviluppate tecniche che prendono il nome di biocorrezione, le quali utilizzano vari microrganismi, e parti di essi, per il recupero di acque e terreni contaminati da scarichi industriali.

Già dal 1960, infatti, con la scoperta di un certo numero di microrganismi del suolo (la maggior parte appartenenti al genere batterico *Pseudomonas*), capaci di degradare sostanze chimiche quali erbicidi, pesticidi, solventi e altri composti organici, quali anelli aromatici, composti contenenti azoto o fosforo, composti clorurati, ha acquistato credito la nozione che la degradazione microbica potrebbe offrire un mezzo economico per smaltire i rifiuti chimici tossici. I composti clorurati, detti “recalcitranti” per l'elevata resistenza alla degradazione sia chimico-fisica che microbiologica, vengono, ad esempio, usati come accettori di elettroni nel processo noto come dechlorinazione riduttiva, operato da batteri anaerobi, come quelli del genere *Desulfomonile*.

L'uso dei batteri risulta molto importante anche nel contrastare l'inquinamento da metalli pesanti in quanto, attraverso un processo noto come biomineralizzazione, alcune specie utilizzano metalli, quali Mn, Fe, o composti contenenti As o Se, come accettori di elettroni permettendo, così, la rimozione di tali agenti inquinanti.

Altre applicazioni dei batteri sono connesse ai loro processi metabolici sfruttabili per ottenere materiali riutilizzabili industrialmente, tale tecnica viene definita bioconversione. I prodotti tradizionalmente ottenibili per via biologica sono, ad esempio, quelli derivanti dalla parziale o completa ossidazione di composti organici, quali alcoli e zuccheri, operata dai batteri acetici che permettono la produzione a livello industriale di acidi organici. Da menzionare, tra i prodotti ottenibili attraverso le

bioconversioni, ci sono gli antibiotici e alcuni amminoacidi, come la lisina prodotta da *Brevibacterium flavum*, e alcune vitamine, come la B<sub>12</sub>, prodotta da batteri appartenenti alla specie *Pseudomonas*.

## 1.2. I Batteri Estremofili

Dal punto di vista tassonomico i batteri estremofili sono Procarioti.

I procarioti sono i più piccoli microrganismi unicellulari esistenti e il loro successo evolutivo risiede indubbiamente nella capacità riproduttiva ed adattativa; essi costituiscono il gruppo di forme viventi più antico della terra e il più numeroso.

I procarioti possono essere suddivisi in archeobatteri ed eubatteri, in particolare i batteri estremofili appartengono, per la maggior parte, alla categoria degli archeobatteri [1].

Gli archeobatteri sono organismi che generalmente vivono in ambienti estremi (acidi, salati o caldi), che mostrano differenze molto marcate nelle loro sequenze metaboliche rispetto a tutti gli altri tipi di cellule.

Le profonde differenze evolutive che dividono gli eubatteri dagli archeobatteri non erano evidenti sulla base del fenotipo, ma divenne chiaro solo dopo il confronto delle loro sequenze nucleotidiche. Le differenze tra questi due gruppi risiedono, infatti, nelle loro sequenze di rRNA, nelle differenti RNA-polimerasi, nei dispositivi cellulari coinvolti nell'espressione genica, nella presenza o meno di introni e nella diversa sensibilità verso gli antibiotici che inibiscono la sintesi delle proteine.

Il termine “estremofilo” fu coniato per la prima volta nel 1974, da allora un numero considerevole di tali batteri è stato isolato ed indagato, ed oggi giorno la particolare attenzione che vi si rivolge è dovuta all'importanza che mostrano alcuni enzimi in essi presenti. Esistono, infatti, numerosi esempi nei processi industriali dell'utilizzo di enzimi estremofili, come nella lavorazione tessile, in quella dei carboidrati o nella produzione di etanolo.

I vantaggi che si ottengono derivano dal fatto che, essendo tali batteri capaci di sopravvivere alle condizioni operative necessarie agli impianti industriali, che risulterebbero proibitive per altri microrganismi, è possibile rendere minime le interferenze dovute ad altri agenti microbici, e inoltre tali batteri sono in grado di nutrirsi di alcuni materiali di scarto delle lavorazioni industriali.

Attualmente i batteri estremofili sono stati classificati in sette categorie basilari:

**TERMOFILI:** che vivono a valori di temperatura  $> 15^{\circ}\text{C}$

**PSICROFILI:** che vivono a valori di temperatura  $< 15^{\circ}\text{C}$

**BAROFILI:** che vivono ad elevate pressioni esterne

**ANAEROBIOSI:** che vivono in assenza di ossigeno

**ACIDOFILI:** che vivono a valori di  $\text{pH} < 7$

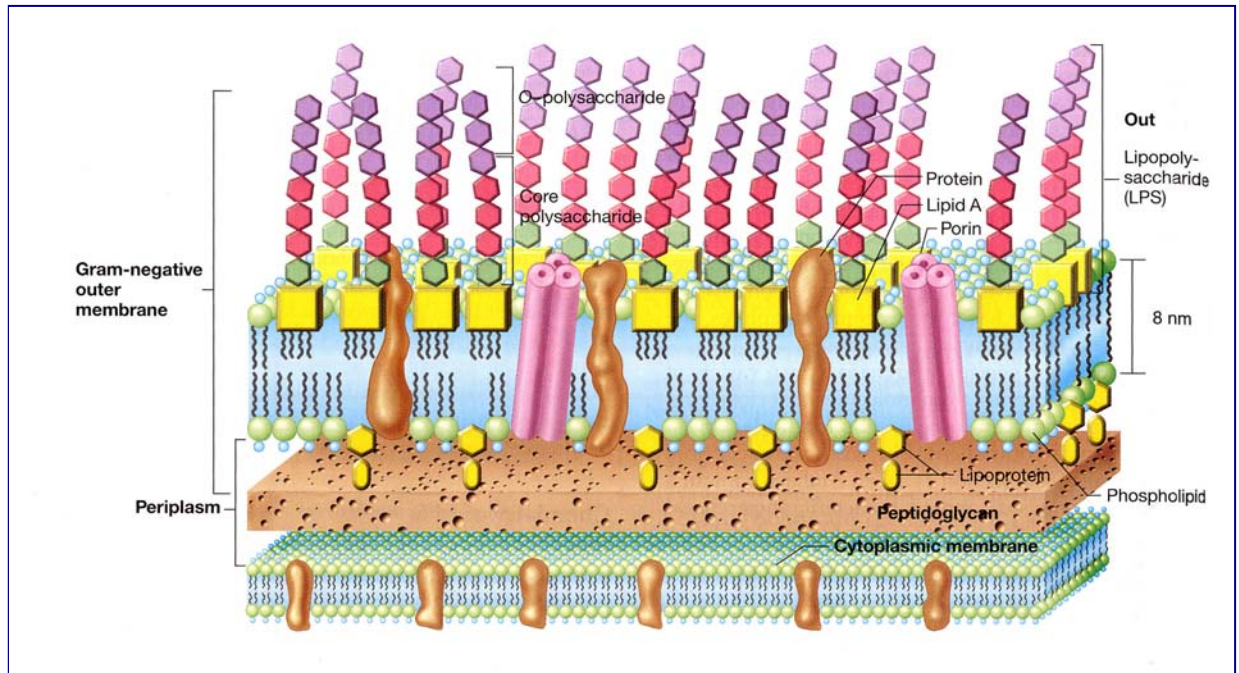
**ALCALOFILI:** che vivono a valori di  $\text{pH} > 7$

**ALOFILI:** che vivono ad alte concentrazioni saline

La progettazione di strategie industriali che prevedano l'utilizzo di tali microrganismi, o di loro parti, presuppone la comprensione dei loro meccanismi di interazione con il mondo esterno. Sono di primaria importanza, quindi, lo studio e la caratterizzazione dei componenti della membrana cellulare ed in particolare dei lipopolisaccaridi, in quanto essi costituiscono la porzione del batterio deputata all'interazione con l'ambiente circostante.

### 1.3. I Lipopolisaccaridi e la membrana esterna dei batteri Gram-Negativi

I lipopolisaccaridi sono una componente critica, se non essenziale, della membrana cellulare esterna (Outer Membrane) dei batteri Gram-negativi [2]:



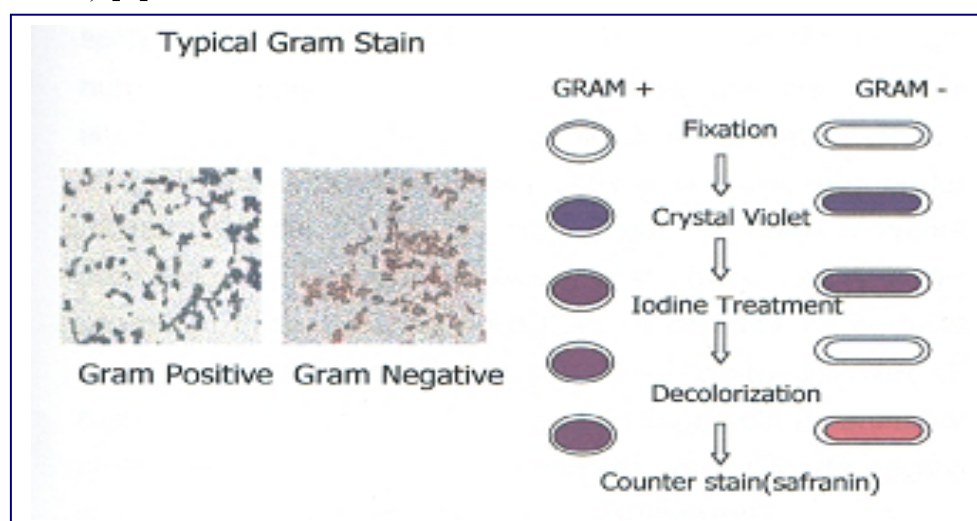
**Figura 3:** Parete cellulare dei batteri Gram-negativi.

Essi a differenza dei batteri Gram-positivi, posseggono una doppia membrana che ricopre la parete cellulare, e cioè una membrana esterna (OM), non assomigliante a nessun'altra membrana biologica, ed una membrana interna, che si presenta come uno strato non strutturato corrispondente al principale componente della parete cellulare dei Gram-positivi, cioè la mureina, un peptidoglicano le cui catene contengono unità di N-acetilglucosammina e acido N-acetilmuramico legate a dei peptidi. Le catene di mureina sono, a loro volta, legate tra loro mediante ponti tetrapeptidici formando una fitta rete, la quale è la principale responsabile della forza meccanica della parete [3].

L'OM ha un'attività enzimatica estremamente limitata e non svolge nessun ruolo nel sistema di trasporto degli elettroni e nella fosforilazione ossidativa [4], ma si è sviluppata come una vera e propria barriera che fornisce protezione al sottostante strato di mureina dall'attacco di enzimi idrolitici.

I lipopolisaccaridi (LPS), ricoprono approssimativamente il 75% della superficie dello strato esterno dell'OM, mentre un restante 25% è costituito essenzialmente da proteine, dette “porine”, che fungono da “pori” o “canali” adibiti alla diffusione attraverso la membrana di piccole molecole idrofiliche di nutrimento e contemporaneamente evitano il passaggio di molecole indesiderate. L'importanza fisiologica delle porine, connessa con la diffusione di nutrienti, antibiotici o inibitori attraverso la membrana, è stata resa evidente tramite l'uso di mutanti deficienti di tali proteine [5,6,7].

L'LPS è la molecola chiave per la funzione dell'OM; mentre il monostrato interno di glicerofosfolipidi è fluido nelle normali condizioni di crescita batterica, il monostrato di LPS esibisce una struttura quasi cristallina, assai poco fluida. Tale struttura è da ricercarsi nella stretta interazione laterale delle molecole di LPS, mediata da cationi bivalenti che coordinano le molecole anioniche di LPS e nella presenza di un set associato di acidi grassi (5-7 per una molecola di LPS). La struttura altamente organizzata dello strato di LPS sull'OM, probabilmente, spiega perché la membrana esterna sia una efficiente barriera alla diffusione di agenti idrofobici e rende conto della particolare resistenza dei batteri Gram-negativi a diversi tipi di antibiotici, agenti tossici denaturanti, coloranti (si veda, ad es., la risposta negativa al saggio colorimetrico di Gram) [8]:



**Figura 4:** Saggio colorimetrico di Gram.



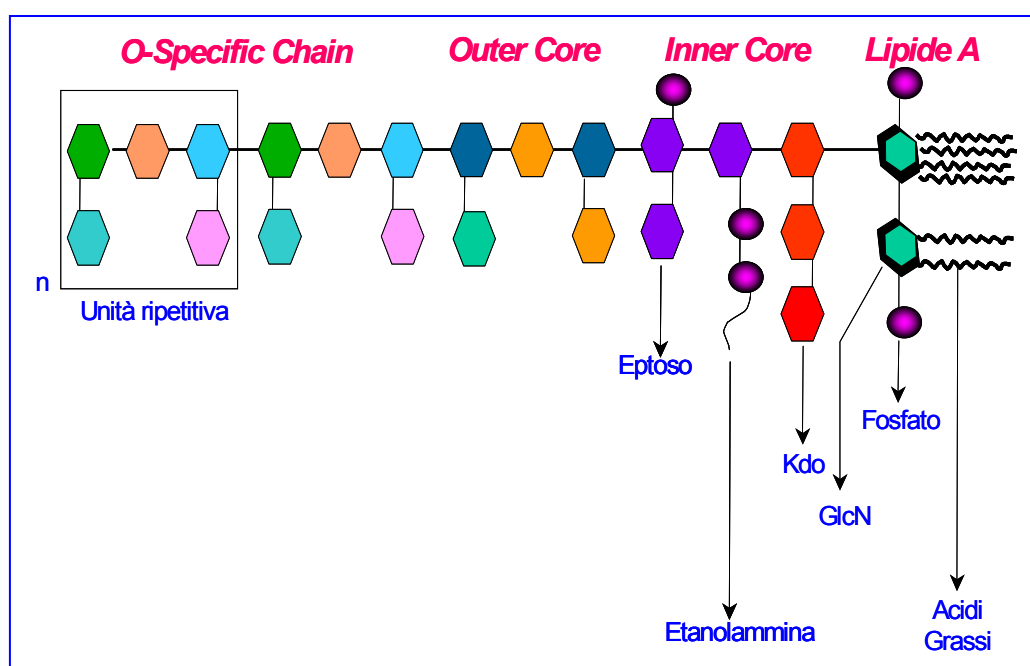
E' stato inoltre dimostrato che inibendo la sintesi di LPS e/o disorganizzando la struttura dello strato lipopolisaccaridico sull'OM si ottiene un drastico incremento della suscettibilità ad antibiotici idrofobici [9].

È noto, infine, che gli LPS (o endotossine batteriche) sono coinvolti nel processo di patogenesi indotto da batteri Gram-negativi patogeni, svolgendo un ruolo di riconoscimento dell'organismo ospite tramite la propria porzione polisaccaridica.

## 1.4. Struttura generale dei lipopolisaccaridi

I lipopolisaccaridi si presentano come macromolecole dotate di una struttura primaria estremamente complessa, ove è possibile individuare tre domini chimicamente e biologicamente distinti [10]:

- Lipide A
- Core
- O-Specific Side Chain



**Figura 5:** *Struttura generale dei Lipopolisaccaridi.*

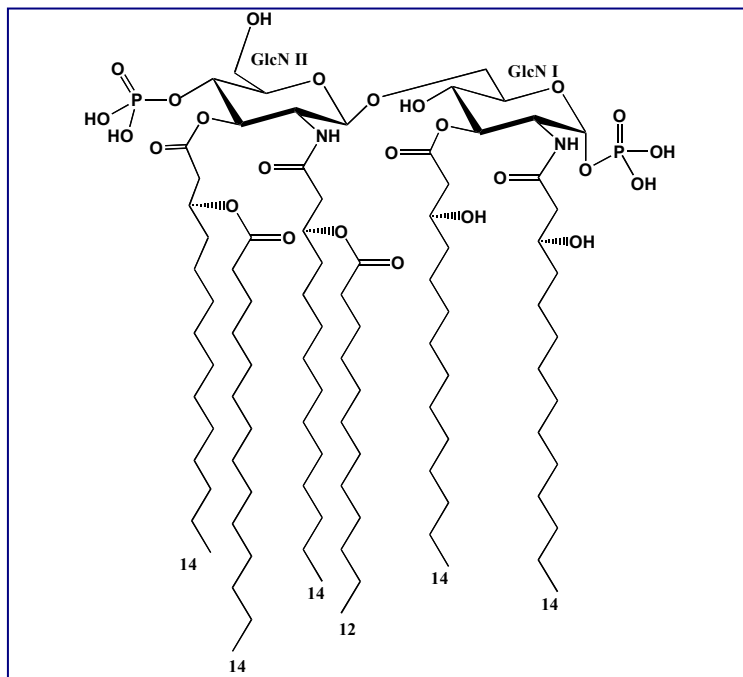
Il **Lipide A** è la porzione lipofila dell'LPS preposta all'ancoraggio dell'intera macromolecola alla membrana esterna dei batteri tramite interazioni idrofobiche ed elettrostatiche. Esso è la componente più conservativa di tutto l'LPS e rappresenta il principio endotossico dei batteri Gram negativi, infatti, è sufficiente ad indurre una risposta immunitaria nell'organismo ospite che può, in alcuni casi, sfociare nello shock settico.

Il Lipide A è costituito da due unità di glucosammina (2-ammino-2-desossi-glucosio), chiamate GlcN I e GlcN II, legate tra loro dal legame glicosidico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6), unico in natura; raramente è possibile trovare scheletri lipidici dove entrambi i

residui di 2-glucosammina, o uno solo, sono sostituiti dalla 3-glucosammina (3-ammino-3-desossiglucopiranosio).

Allo scheletro disaccaridico si trovano legate catene di acidi grassi. Questi sono divisi in due categorie: acidi grassi primari e secondari. I primari sono a configurazione *R*, sono 3-ossidrilati, saturi, a catena carboniosa medio-lunga (all'incirca 10-22 atomi) e direttamente legati ai residui zuccherini tramite legami ammidici o esterei, coinvolgendo le posizioni 2 e 3 del residuo riducente (GlcN I), e 2', 3' del residuo non riducente (GlcN II). Questi acidi grassi sono tipici del lipide A e quindi sono considerati marcatori dei batteri Gram negativi. Gli acidi grassi secondari sono a configurazione *S*, quando sono ossidrilati lo sono in posizione 2, sono saturi ed hanno una lunghezza media, si trovano legati agli acidi grassi primari in posizione 3 tramite un legame estereo. Sono proprio le catene di acidi grassi responsabili del carattere idrofobico del lipide A.

In posizione 1 e 4' dello scheletro lipidico ritroviamo due gruppi fosfato, denominati "teste polari", presenti in quantità non stechiometrica. Ad essi possono poi essere legati diversi sostituenti, come l'etanolammina, la glucosammina, ovvero tutti sostituenti con ammino gruppi, capaci cioè di controbilanciare la carica negativa dei fosfati. In genere la posizione 4 della GlcN I è libera.



**Figura 6:** Struttura chimica del Lipide A isolato da *E. coli*.

In posizione 6 della GlcN II è legato un monosio caratteristico degli LPS, e cioè il Kdo (acido 2-cheto-3-desossi-D-*manno*-ottulosonico). Esso rappresenta il fattore di congiunzione tra la parte lipidica e quella zuccherina e cioè tra il lipide A ed il core. Le sue caratteristiche chimiche, di acido ulosonico e di chetoso con posizione 3 non ossidrilata, fa sì che il suo legame  $\beta$ -(2→6) sia molto labile, infatti è possibile idrolizzarlo in condizioni blande, senza intaccare gli altri legami glicosidici. La struttura generale del lipide A con il Kdo è l'elemento strutturale più conservato di un LPS, soprattutto se è confrontato con la struttura della catena polisaccaridica che risulta essere altamente variabile [6].

Il Core è la porzione etero-oligosaccaridica dell'LPS [6], è costituito da circa quindici monosaccaridi ed è suddiviso in due distinti domini, l'**inner-core** e l'**outer-core**. L'**inner-core** è costituito da monosaccaridi caratteristici, quali il Kdo, eptosi, come L-*glicero*-D-*manno*-eptopiranosio (L,D-Hep), D-*glicero*-D-*manno*-eptopiranosio (D,D-Hep); l'**outer-core** è invece costituito da pochi residui glicosidici: zuccheri neutri, acidi uronici e amminozuccheri. Il legame tra il core ed il lipide A avviene sempre attraverso un residuo di Kdo, il quale è sostituito all'O-4 da un monosaccaride o disaccaride del Kdo, o da fosfato. Il core è sempre carico negativamente, questo a causa di sostituenti fosforilati (fosfati, pirofosfati, pirofosfoetanolamina, fosfoarabinosammina) o di zuccheri acidi; probabilmente è proprio la presenza di questi gruppi anionici che garantisce il corretto assemblaggio alla membrana ad opera di interazioni elettrostatiche con cationi bivalenti ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) sulla sua superficie esterna, che contribuiscono a ridurre la permeabilità della membrana stessa ed ad aumentarne la stabilità per formazione di una barriera protettiva rigida e resistente.

La regione del core oligosaccaridica, insieme al lipide A, rappresenta una struttura minima comune ai lipopolisaccaridi [11], e questo ci fa capire come tali componenti siano importanti per la funzionalità della membrana e la vita stessa del batterio, quindi identificarne la struttura primaria può essere utile per lo studio delle glicosiltrasferasi onde sfruttarle come bersagli di una terapia antibiotica.

L'**O-specific side chain** (O-antigen polysaccharide, O-chain) costituisce la porzione polisaccaridica degli LPS che sporge all'esterno del sistema batterico [4,12]. Essa conferisce alla parete batterica proprietà idrofiliche, proteggendola da eventuali agenti

idrofobici dannosi, infatti la struttura primaria dell'O-chain può essere modificata in condizioni di forte stress ambientale per rinforzare e proteggere la membrana esterna stessa. Nei batteri fitopatogeni, essa può favorire l'adesione alle cellule ospiti e l'inizio della simbiosi con microrganismi unicellulari, quali ad esempio le alghe, nei mammiferi, invece, l'O-chain rappresenta il determinante antigenico degli LPS, cioè la porzione riconosciuta dagli anticorpi dell'organismo ospite. L'O-chain è la porzione dotata di maggiore eterogeneità strutturale, il cui peso molecolare può raggiungere l'ordine delle decine di migliaia di Dalton, e perciò può essere facilmente evidenziata mediante analisi elettroforetica, in condizioni denaturanti su gel di acrilammide, e mediante tecniche di spettrometria di massa.

L'O-chain è generalmente caratterizzata da una struttura primaria regolare, che può essere spiegata in base al meccanismo biosintetico di formazione: la catena non si forma per aggiunte successive di singole unità monosaccaridiche, ma per addizione di intere unità oligosaccaridiche, presintetizzate ad opera di specifici enzimi, all'estremità riducente della catena polimerica in crescita.

La presenza o meno dell'O-chain conferisce alla membrana del batterio proprietà di permeabilità che si riflettono macroscopicamente sulla morfologia stessa della membrana cellulare. Quindi è possibile, attraverso un'analisi al microscopio elettronico, suddividere i batteri in due categorie:

☉ SMOOTH: gli LPS di tali batteri presentano i tre tipici domini strutturali e la presenza, in essi, di una lunga O-chain conferisce alla membrana un aspetto liscio ed omogeneo.

☉ ROUGH: gli LPS di tali batteri presentano un numero di unità ripetitive dell'O-chain ristretto o nullo, questo conferisce alla membrana un aspetto rugoso.

## 1.5. Batteri alofili e alcalofili: *Halomonas pantelleriensis*.

La concentrazione salina è uno dei fattori che più di tutti gli altri influenza la sopravvivenza delle specie viventi. Poche, infatti, sono le tipologie di organismi eurialini, organismi, cioè, le cui condizioni ottimali di crescita possono variare in un ampio intervallo di concentrazioni saline. Questo è un fattore che si manifesta sotto molteplici aspetti, in quanto se la concentrazione salina, ad esempio, aumenta vi è meno acqua per sciogliere i nutrienti, per far avvenire i processi metabolici, per l'idratazione di proteine, di acidi nucleici, etc.. Quindi, col tempo, la biodiversità degli ecosistemi alofili e l'altotolleranza è diventata di considerevole interesse scientifico e biotecnologico per le ampie prospettive di applicazione nell'industria fermentativa e nell'agricoltura [13].

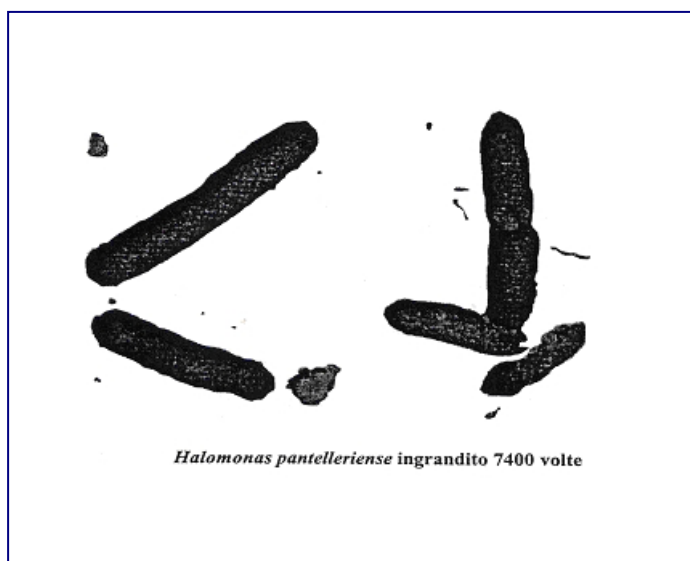
Tra gli estremofili, un altro fenotipo interessante è quello degli alcalofili. Il pH, infatti, è un altro fattore che determina la crescita degli organismi viventi in modo molto complesso, basti pensare al ristretto intervallo di pH di cui necessita un organismo onde non interferire, in maniera definitiva, con le sue complesse funzioni vitali.

In Natura sono pochi gli organismi adattatisi a vivere in entrambi questi ambienti ostili, in quanto l'adattamento a nuove situazioni ambientali è di per se già molto complicato quando si ha a che fare con il cambiamento di una sola delle sopracitate variazioni. La comprensione della fisiologia di un organismo modificatosi per sopravvivere al cambiamento combinato di questi due parametri proibitivi allo sviluppo e alla crescita della vita, è senz'altro importante per comprendere come esso abbia mutato le proprie funzioni per resistere a tali stress ambientali. Molti studi sono stati condotti finora su organismi che riescono a sopravvivere in condizioni sfavorevoli alla crescita e allo sviluppo della vita, i risultati ottenuti non hanno, però, consentito di determinare un'ipotesi generale per comprendere, in maniera completa, tali adattamenti.

È possibile che uno dei meccanismi, con cui i batteri si siano adattati alle più svariate concentrazioni idrogenioniche, sia stato un irrigidimento della membrana cellulare, onde poter conservare all'interno, quelle condizioni ottimali per lo svolgimento delle funzioni vitali [14].

In tale contesto è interessante focalizzare l'attenzione sui lipopolisaccaridi (LPS); infatti, quest'ultimi, possono subire modificazioni [15] con specifiche funzionalità, onde contrastare lo stress ambientale. Porre, quindi, l'attenzione sulla struttura dei lipopolisaccaridi presenti in tali organismi è di fondamentale importanza per una piena e concreta comprensione degli adattamenti di quest'ultimi in condizioni vitali avverse.

Uno dei batteri presi in esame nella mia tesi di dottorato è *Halomonas Deleja pantelleriensis*, un batterio alcalofilo e alofilo [16].



**Figura.7:** *Halomonas Deleja pantelleriensis*.

L'habitat naturale di questo batterio è il lago di origini vulcaniche "Specchio di Venere", situato a Pantelleria. Esso è un archeobatterio Gram negativo, aerobio obbligato, le cui condizioni ottimali di crescita devono rispettare una temperatura di 35°C, un pH uguale a 9.0 e una concentrazione salina pari a 1.8 M. Chiaramente sono condizioni al di fuori di quelle naturali per una normale vita microbica. La particolarità di questo batterio eurialino risiede certamente nella sua capacità ad adattarsi alle più svariate concentrazioni saline, in quanto, là dove la presenza di sali fosse inferiore alle condizioni ottimali, esso riesce ugualmente a crescere, a patto che la concentrazione idrogenionica diminuisca ulteriormente.

I microrganismi hanno evoluto essenzialmente tre strategie per conservare, durante le oscillazioni ioniche dell'ambiente circostante, il giusto turgore cellulare, che

rappresenta la forza motrice per la crescita della cellula. Tale turgore è dato dalla differenza tra il potenziale dei soluti nel mezzo e quello intracellulare.

Le strategie adottate sono:

- ➡ l'accumulo di ioni inorganici, come potassio o magnesio;
- ➡ la biosintesi di enzimi alotolleranti o, in alcuni casi, sale dipendenti;
- ➡ l'accumulo, sia mediante trasporto sia mediante sintesi "ex novo", di molecole organiche, chiamate "soluti compatibili" [17].

Tale termine è stato coniato per descrivere composti a basso peso molecolare, che si accumulano ad alte concentrazioni intracellulari e che sono compatibili con l'attività enzimatica [18]. L'accumulo di "soluti compatibili" sembra essere una risposta, da parte delle cellule microbiche, ad una sollecitazione esterna, queste sostanze, infatti, mantengono un equilibrio tra le aree superficiali delle macromolecole e la fase acquosa, opponendosi a drammatici cambiamenti della densità dell'acqua. Si è notato che nel caso del batterio *Halomonas pantelleriensis* (*Hp*) un soluto compatibile è il poliidrossibutirrato (PHB).

Queste premesse rendono *Hp* interessante da numerosi punti di vista, non ultimo la possibile utilizzazione in molteplici applicazioni biotecnologiche, in impianti industriali o come battericida naturale. Ciò ha indotto numerosi ricercatori ad effettuare analisi approfondite allo scopo di comprenderne i meccanismi alla base della sua sopravvivenza.

Presupposto indispensabile per una completa e approfondita conoscenza dei processi biologici coinvolti nel metabolismo di tale microorganismo è, sicuramente, la conoscenza a livello molecolare dei costituenti della membrana cellulare, della sua stabilità e quindi della sua funzionalità. La determinazione strutturale della frazione lipopolisaccaridica presente nel batterio, ne rappresenta, quindi, un tassello fondamentale.



## **.6. *Escherichia coli* K12 e *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125**

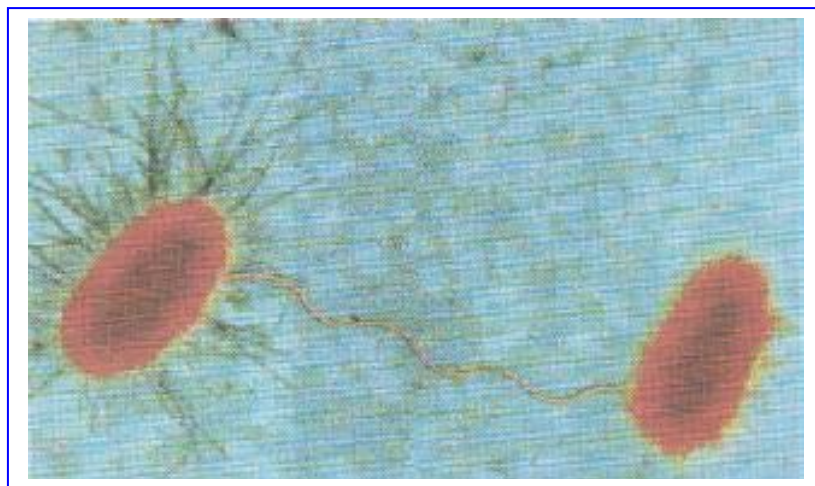
*Escherichia coli* è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Le sue cellule presentano una forma a bastoncino con una lunghezza tipicamente di  $2\mu\text{m}$  e un diametro di  $1\mu\text{m}$ , il peso, invece, raggiunge i  $2 \cdot 10^{-2}$  g; il suo DNA, che ha una massa molecolare di  $2.5 \cdot 10^9$  dalton, si pensi codifichi per circa 3000 proteine. *E. coli* è presente normalmente nell'intestino degli animali e degli esseri umani; questo batterio è utile all'organismo sia per inibire la crescita di specie batteriche nocive che per sintetizzare apprezzabili quantità di vitamine.

Esso è l'organismo biologicamente più caratterizzato ed è per tale motivo che spesso viene utilizzato per i più svariati esperimenti nei laboratori di biologia molecolare. Uno di questi è la coniugazione, ovvero il processo con cui avviene il trasferimento di materiale genetico da un batterio ad un altro. Sebbene il cromosoma batterico contenga tutti i geni necessari alla crescita e alla riproduzione della cellula tutti i tipi di batteri presentano altre molecole di DNA conosciute come plasmidi. Essi sono molto più piccoli del cromosoma batterico e possono contenere da due a una trentina di geni. Come il cromosoma batterico, anche i plasmidi sono circolari e autoduplicanti.

Il primo plasmide ad essere identificato è stato il fattore F di *E. coli*. Questo plasmide può trovarsi libero nel citoplasma oppure integrato nel cromosoma batterico e contiene circa 25 geni, molti dei quali controllano la produzione di lunghe strutture proteiche a forma di bastoncino, i pili. Questi ultimi hanno la specifica funzione di riconoscere una proteina di superficie del batterio ricevente (privo di plasmide F, detto anche  $F^-$ ) e di legarsi ad essa. La coniugazione ha inizio soltanto quando i pili del donatore (contenente il plasmide F, detto anche  $F^+$ ) prendono contatto con la superficie del ricevente. Le cellule  $F^+$  possono attaccarsi alle cellule  $F^-$  per mezzo dei pili e trasferire una copia del loro plasmide F attraverso ponti citoplasmatici (fig 8). Questo trasferimento di DNA da una cellula a un'altra mediante il contatto cellula-cellula è noto come coniugazione.

Durante la coniugazione il trasferimento di materiale genico avviene solo tra batteri che sono in contatto diretto tra loro e in una sola direzione. In generale l'intero processo comprende due stadi: prima si instaura un contatto diretto tra il batterio donatore  $F^+$  e il

batterio ricevente  $F^-$  e, successivamente, del materiale genico viene trasportato dal donatore al ricevente. Generalmente viene trasferito il solo plasmide F ma, nel caso in cui il plasmide sia integrato nel cromosoma del donatore, possono essere trasferiti anche geni cromosomici.



**Figura 8:** Processo di coniugazione tra batteri.

Durante un esperimento di coniugazione effettuato tra *Escherichia coli* K12 strain S17- $\lambda$ pir e il batterio psicrofilo *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Ph) TAC 125 si è riscontrata una crescita di colonie batteriche insolita, ovvero con caratteristiche fenotipiche e molecolari diverse rispetto alle normali colonie di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125. Tali differenze, riportate in Tabella 1, hanno fatto supporre che queste colonie fossero dovute ad una mutazione del TAC 125 avvenuta durante la coniugazione.

**Tabella 1:** Differenze fenotipiche e molecolari tra Ph TAC 125 e il suo mutante.

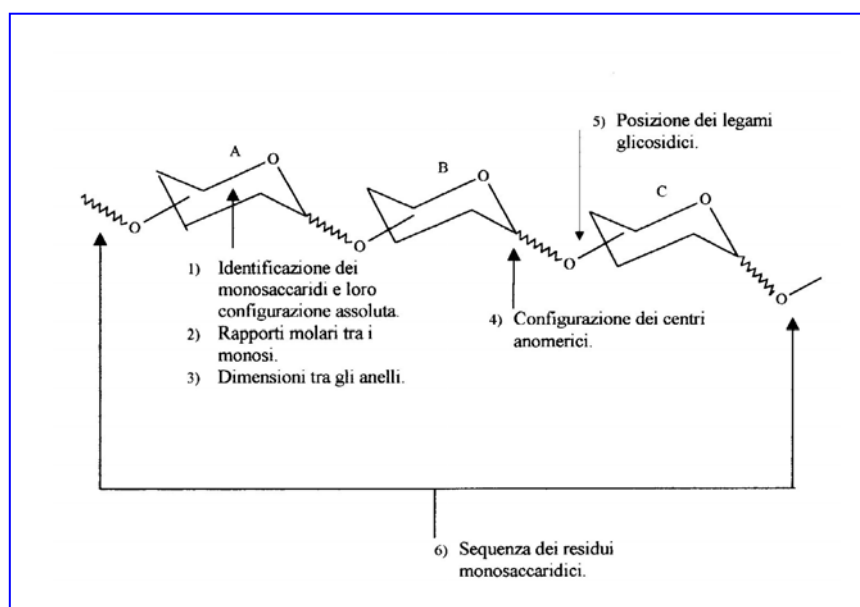
<i>P.h.</i> TAC 125	Mutante
<b>MORFOLOGIA DELLE COLONIE</b>	
rosa	bianca
<b>CRESCITA</b>	
4°C e 15°C	15°C
Secrezione di $\alpha$ -amilasi ricombinante	
	Formazione di corpi inclusi di porine

Lo scopo della mia tesi di dottorato è la caratterizzazione della frazione oligosaccaridica di tale mutante onde verificarne le differenze rispetto alla struttura del core del *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125, già caratterizzato dal gruppo di ricerca dove ho svolto la mia ricerca nell'ambito del dottorato [19].

## 2. METODI PER LA CARATTERIZZAZIONE STRUTTURALE DI UN POLISACCARIDE

La caratterizzazione della struttura primaria di un polisaccaride implica la determinazione di molti parametri costituzionali e configurazionali. Vista l'elevata complessità molecolare di tali composti, vengono utilizzati sia metodi chimici che spettroscopici. Di. Difatti, la sola identificazione dei monosaccaridi e la loro sequenza non sono informazioni tali da poter identificare, in maniera univoca, un polisaccaride. Bisogna considerare il fatto che ogni residuo monosaccaridico, possedendo più gruppi ossidrilici, introduce un elemento variabile nella posizione del legame interglicosidico e può dar luogo anche a molecole ramificate. Inoltre la diversa dimensione degli anelli dei monosi (furanici o piranici) e le due possibili configurazioni dei centri anomeric ( $\alpha$  o  $\beta$ ), rendono molto elevato il numero di strutture possibili per una stessa sequenza monosaccaridica.

Risulta, perciò, evidente la necessità di integrare procedure d'analisi chimiche a moderne metodologie chimico-fisiche al fine di ottenere tutte le informazioni necessarie per la caratterizzazione strutturale di un polisaccaride.



**Figura 9:** caratterizzazione strutturale di un polisaccaride.

Per questo tipo di analisi è di fondamentale importanza avere a disposizione materiale in forma sufficientemente pura ed omogenea.

Il primo passo da affrontare è isolamento del LPS dalla membrana cellulare con metodi che ne evitino la degradazione, ma che contemporaneamente siano in grado di fornire materiale esente il più possibile da contaminanti (proteine, acidi nucleici e fosfolipidi).

## 2.1. Isolamento e purificazione

Quando non si è a conoscenza della morfologia della membrana cellulare esterna dei batteri, quando, in altre parole, non si sa se essi appartengono alla categoria smooth o rough, e quindi se producono LPS o LOS, bisogna estrarre il materiale di interesse attraverso due distinte procedure, differenti a seconda della natura più lipofilica (tipica dei LOS) o idrofilica (tipica degli LPS) delle molecole sotto indagine.

Nel caso dei **LOS** il metodo di estrazione prevede l'utilizzo di una miscela costituita da fenolo acquoso, cloroformio ed etere di petrolio, in rapporto 2: 5: 8, la cosiddetta miscela PCP [20], da cui prende nome il metodo di estrazione. Tale miscela è un sistema monofasico che può apparire lattescente, ma che è resa trasparente con l'aggiunta di scaglie di fenolo solido. In questa miscela si sospendono le cellule secche e si omogenizza in maniera vigorosa per 15 minuti, ottenendo in tal modo una sospensione fine. Se questa dovesse apparire viscosa, si può aggiungere altra miscela, altrimenti la si lascia a temperatura ambiente per un'ora. Si esegue poi una centrifugazione vorticoso, separando così il surnatante, contenente il LOS, dal materiale cellulare, su quest'ultimo si effettua la stessa estrazione per altre due volte.

I tre surnatanti vengono mescolati insieme e lavorati; i solventi bassobollenti vengono allontanati mediante evaporazione. Sulla sola fase fenolica ottenuta si effettua una precipitazione con acqua, che viene aggiunta goccia a goccia fino a quando si osserva la formazione di un solido bianco flocculento. E' importante, durante tale fase, porre particolare attenzione ad evitare la formazione di fenolo solido. Il LOS precipitato viene isolato mediante centrifugazione e lavato dapprima con piccoli volumi di una soluzione di fenolo all' 80% e poi con acetone, che provvede a rimuovere in maniera completa il fenolo. Infine il precipitato è sciolto in acqua e liofilizzato.

Il surnatante è scartato in quanto contiene materiale cellulare in ammontare trascurabile.

Il metodo è blando, perché condotto a temperature tra i 5°C e i 20°C, inoltre consente di ottenere materiale puro e scevro da acidi nucleici e proteine.

Nel caso dell' estrazione di **LPS** (batteri di tipo smooth) il metodo più comunemente utilizzato è quello che prevede l'uso di una miscela di fenolo/acqua 9: 1

ad una temperatura di 68°C [21]. A tale temperatura la miscela di fenolo acquoso, mista al materiale cellulare, forma una sospensione monofasica che in seguito ad un brusco raffreddamento dà luogo ad una fase inferiore, quella fenolica, contenente principalmente proteine e lipidi, un'interfaccia solida, di materiale residuo cellulare, ed una fase superiore, quella acquosa, contenente polisaccaridi, acidi nucleici e proteine residue.

Secondo il maggiore o minore carattere idrofilico di un LPS, quest'ultimo si ripartirà rispettivamente in fase acquosa o in quella fenolica. Entrambe le fasi sono poi dializzate e liofilizzate.

## 2.2. Identificazione del lipopolisaccaride

Per identificare il materiale estratto dalle cellule batteriche bisogna evidenziarne gli elementi strutturali che contraddistinguono il LOS dagli altri polisaccaridi. La presenza delle seguenti caratteristiche è da ritenersi sufficiente affinché si riconosca il lipopolisaccaride nell'estratto cellulare:

- Positività al saggio dell'acido tiobarbiturico periodato (saggio colorimetrico diagnostico della presenza del Kdo, tipico di un LPS) [22]
- Evidenza alla GC-MS, della presenza di Kdo, nell'analisi glicosidica, e degli acidi grassi  $\beta/\gamma$ -ossidrilati, caratteristici del lipide A, nell'analisi dei lipidi.
- Pattern elettroforetico, a gradini ("ladder like") più o meno esteso e/o prevalentemente a fine corsa a seconda che l'LPS sia di tipo S o R [21].

Una volta ottenuta la frazione lipopolisaccaridica, ed averne identificato il tipo, vale a dire LPS o LOS, occorre studiarne separatamente la porzione lipidica e la catena polisaccaridica.

Tale separazione è condotta in maniera differente a seconda del tipo di lipopolisaccaride ottenuto.



### 2.3. Idrolisi blanda di un LPS

L'anfifilicità tipica degli LPS ne rende molto difficile l'analisi strutturale, in quanto poco miscibili in qualsiasi solvente, in ragione della loro notevole propensione a formare aggregati micellari assai difficilmente trattabili. Per tale motivo appare conveniente scindere la porzione lipidica da quella zuccherina, in modo da poterle analizzare più agevolmente in maniera separata.

La separazione della porzione lipidica dalla catena polisaccaridica è ottenuta tramite un'idrolisi blanda in condizioni acide, con AcOH 1% , che sfruttando la labilità del legame  $\beta$ -(2→6) tra il Kdo ed una delle due unità di glucosammina, facenti parte del lipide A, separa le due zone strutturalmente differenti di un LPS [23].

La porzione lipidica precipita dalla miscela di reazione, rendendosi facilmente separabile dalla catena saccaridica, che rimane in soluzione, tramite una semplice centrifugazione. Il surnatante è portato a secco e sottoposto in seguito ad una cromatografia ad esclusione molecolare al fine di separare la *O*-chain (di elevato peso molecolare), eluita, solitamente, nel volume escluso della colonna, dal core e dai frammenti di Kdo, fortemente trattenuti.

Le frazioni saccaridiche così isolate (*O*-chain, core) sono sottoposte ad una serie combinata di indagini chimiche, spettroscopiche e spettrometriche.

## 2.4. Allontanamento degli acidi grassi da un LOS

Un LOS da un punto di vista strutturale può essere considerato un vero e proprio glicolipide, per cui l'approccio chimico previsto per un LPS, ovvero l'idrolisi blanda, non può essere effettuata. Difatti questo tipo di idrolisi, sfruttando la labilità del legame glicosidico di un 3-desossi chetoso, risulta in un oligosaccaride la cui estremità riducente rappresenta un sito di elevata eterogeneità. Infatti, il Kdo riducente in ambiente acido può disidratare, dare la sua forma  $\alpha$  e  $\beta$  piranica e convertirsi in  $\gamma$  e  $\delta$  lattone. La complessa miscela di oligosaccaridiche ne deriva complica l'isolamento e la determinazione strutturale dell'oligosaccaride originale.

Si preferisce quindi un approccio di tipo basico al fine di deacilare completamente il glicolipide. Infatti tale metodo non è distruttivo per gli altri legami glicosidici, avendo a che fare con acetali e chetali che non si idrolizzano in ambiente basico.

La prima operazione che si esegue è la de-O-acilazione del campione mediante idrazina ( $\text{NH}_2\text{NH}_2$ ) anidra a  $37^\circ\text{C}$  per 1.5 h. Con tale operazione si lasciano intatti gli acidi grassi legati come ammidi.

A questo punto il campione viene defosforilato con HF al 48% per 48 h a  $4^\circ\text{C}$ . Questa reazione provoca la defosforilazione simultanea della posizione 4' della glucosammina non riducente (GlcN II) e della posizione anomERICA della glucosammina riducente (GlcN I) e di tutte le altre eventuali posizioni all'interno dell'oligosaccaride che sono fosforilate. La GlcN I viene quindi ridotta con  $\text{NaBH}_4$  a temperatura ambiente per una notte. Con questa ultima reazione il sito riducente (emiacetalico) della GlcN I è ridotto ad alcool, preservando l'oligosaccaride dall'eventuale reazione di scissione in ambiente basico. Si procede quindi alla completa deacilazione del campione, esso è trattato con KOH 4 M a  $120^\circ\text{C}$  per 16 h, si ottiene così un oligosaccaride alditolo che comprende anche lo scheletro disaccaridico del lipide A.

Quest'oligosaccaride è soggetto quindi alle classiche procedure per l'analisi strutturale.

## 2.5. Tecniche cromatografiche

La tecnica cromatografica più comunemente impiegata per una purificazione spinta del polisaccaride è la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC).

Il supporto cromatografico può essere assimilato a sfere porose; le molecole di dimensioni maggiori, non essendo in grado di attraversare i cunicoli all'interno della particella porosa, passano all'esterno e quindi non sono trattenute, mentre quelle più piccole, avendo un percorso cromatografico maggiore, risultano eluite in ritardo.

I gel utilizzati si differenziano per il tipo di materiale, per la stabilità e le proprietà chimico-fisiche e per le proprietà cromatografiche stesse (selettività). Infatti, il grado di porosità, ad esempio, è un parametro che determina l'intervallo di discriminazione dei pesi molecolari. I gel che vengono più comunemente utilizzati sono destrani e/o poliacrilammide con un numero variabile di legami crociati (Sephadex, BioGel P, Sephacryl).

La cromatografia ad esclusione richiede una sola fase mobile ed una eluizione isocratica. L'eluente impiegato è generalmente una soluzione di bassa forza ionica ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10-50 mM) in modo tale da migliorare la risoluzione cromatografica. In alcuni casi anche la sola acqua MilliQ, risulta un ottimo eluente.

I supporti cromatografici usati per la purificazione dei campioni sono:

☛ Sephacryl S-300

☛ Sephadex G-10

☛ Butyl Sepharose

I rivelatori che si utilizzano con questa tecnica sono generalmente ad indice di rifrazione, in modo tale da monitorare l'eluato in continuo.


### 2.5.1. Cromatografia liquida ad alta pressione

La cromatografia ad alta pressione HPLC (High Performance Liquid Chromatography o High Pressure Liquid Chromatography) si basa sui principi generali della cromatografia d'adsorbimento, di ripartizione, di scambio ionico ecc.; essa permette di analizzare miscele difficilmente risolubili con le tradizionali cromatografie.

Le colonne HPLC hanno una maggiore risoluzione dovuta all'impiego di fasi stazionarie finemente suddivise allo scopo di realizzare una superficie di interazione elevata tra la matrice e l'analita ed un migliore impiccamento. Questo comporta che la fase mobile debba attraversare la fase stazionaria ad una pressione molto alta per permettere un'eluizione in tempi ragionevoli.

Per questa tecnica cromatografica, la fase stazionaria, che presenta una granulometria generalmente compresa tra 5-10  $\mu\text{m}$ , deve avere come requisiti indispensabili la stabilità idrolitica e termica, e deve resistere all'azione meccanica del flusso dell'eluente.

A seconda delle caratteristiche della fase stazionaria solida, si può operare sia in fase normale che in fase inversa in funzione della polarità dei gruppi legati al supporto, si avrà così:

 fase diretta: silice o silice disattivata in vario modo (es:gruppi cianopropilici, gruppi etrei, etc.)

 fase inversa: silice legata a  $-\text{C}_{18}$ ,  $-\text{C}_8$ , -fenile

L'ordine di polarità dei vari gruppi legati alla silice varia secondo la seguente scala di polarità:  $-\text{CN} > -\text{NH}_2 > -\text{C}(\text{CH}_3)_2 > -\text{C}_8 > -\text{fenile}$

Nell'HPLC la fase mobile verrà scelta in funzione delle sostanze da separare e deve presentare caratteristiche tali da non danneggiare le parti costituenti il sistema: deve presentare una bassa viscosità, in quanto questo permette di operare in condizioni di pressione non troppo elevata; deve essere degassato prima dell'introduzione in colonna, in quanto la presenza di aria può dare alterazioni nella risposta del rivelatore; deve essere puro, perché la presenza di sostanze estranee può danneggiare la colonna; deve avere una temperatura di ebollizione sufficientemente elevata per evitare fenomeni di evaporazione alle temperature usate durante l'operazione cromatografica.

I tipi di rivelatori che possono essere utilizzati per l' HPLC sono vari, in relazione alla natura delle sostanze che debbono essere evidenziate.

I rivelatori più comunemente usati sono:

- ✱ spettrofotometrici, (UV etc.), concentrazione minima rilevabile  $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  g/ml;
- ✱ a indice di rifrazione.

E' evidente che, qualunque sia il rivelatore usato, la fase mobile non deve in alcun modo interferire nella determinazione ed il rumore di fondo dello strumento non deve essere superiore al segnale più basso dell'analita in minore concentrazione.

Diversamente dalla gascromatografia, l'HPLC non separa sostanze che si trovano allo stato di vapore, ma permette la separazione di tutte quelle sostanze che difficilmente possono essere vaporizzabili o che in ogni modo possano alterarsi ad una temperatura più alta di quella ambiente; si può affermare che la gascromatografia e l'HPLC sono due tecniche cromatografiche che si completano a vicenda in quanto permettono di separare i costituenti di una qualsiasi miscela.

I vantaggi dell'HPLC sono:

- ✱ tempi brevi d'esecuzione
- ✱ riproducibilità delle condizioni sperimentali
- ✱ possono essere analizzate miscele di sostanze termolabili, esplosive e non volatili.
- ✱ possono essere evidenziate piccolissime quantità di sostanze grazie all'alta sensibilità dei rivelatori che si utilizzano.

## 2.6. Analisi quali-quantitativa dei monosi

Dopo aver isolato e purificato l'oligosaccaride, il primo passo della sua caratterizzazione strutturale consiste nell'analisi glicosidica, cioè nell'identificazione e nella quantificazione dei monosaccaridi. Questo tipo di analisi è condotta idrolizzando l'oligosaccaride e separando i monosi risultanti con svariati metodi cromatografici, che vanno dalla TLC alla cromatografia in fase gassosa.

Le condizioni di idrolisi acida per degradare completamente una catena saccaridica sono molteplici: TFA 2 M a 120°C per 1-2 h oppure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5-1 M a 100°C per 4-6 h, per poli-oligosaccaridi contenenti aldosi; HCl 4 M a 100°C per 6 h, oppure H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/AcOH a 100°C per 9 h, per la scissione dei legami glicosidici degli amminozuccheri.

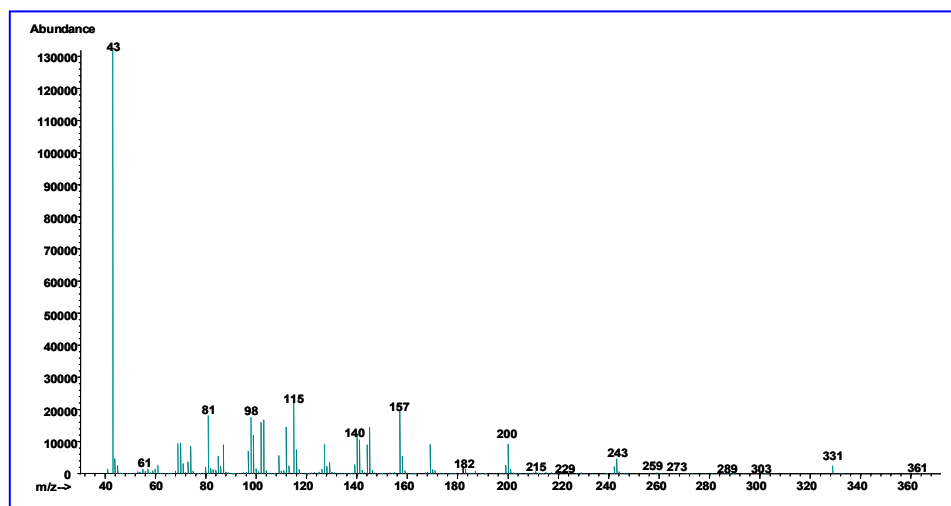
Durante l'idrolisi si possono, però, verificare problemi di degradazione dei monosi, che possono essere risolti con reazioni di idrolisi e derivatizzazione acetale o chetale, si può effettuare, ad esempio, una metanolisi (MeOH/HCl anidro 1 M a 80°C per 2-20 h, a seconda della forza dei legami glicosidici), bloccando così gli ossidrili liberi come *O*-metili. I monosi liberi sono quindi identificati tramite cromatografia su carta o su strato sottile, per confronto con standard.

Di notevole importanza è anche il metodo cromatografico GC-MS dei prodotti idrolizzati. L'utilizzo del gas-cromatografo comporta la derivatizzazione delle unità monosaccaridiche in sostanze volatili e stabili termicamente, quali metileteri, trimetilsilileteri (TMS) o alditoli acetitati; il metodo risulta essere più efficace quando è accoppiato alla spettrometria di massa (GC-MS).

La procedura per ottenere i derivati TMS o peracetilati prevede la conversione dei monosi in *O*-metiglicosidi con MeOH/HCl e successiva sililazione o acetilazione (MGA). Quest'ultima è effettuata con anidride acetica (Ac<sub>2</sub>O) in piridina (Py), per 30 minuti a 100°C. I campioni ottenuti vengono poi analizzati alla GC-MS. Tale tecnica è la più usata per l'identificazione qualitativa e quantitativa di mono ed oligosaccaridi a basso peso molecolare, avendo essa anche la possibilità di risolvere e caratterizzare in un unico esperimento miscele complesse. Generalmente è in uso la tecnica di ionizzazione ad impatto elettronico (EI) che, provocando una consistente frammentazione secondaria, permette di ottenere importanti informazioni strutturali.

Il risultato dell'analisi è visualizzato in un cromatogramma, in cui ogni monoso derivatizzato ha un proprio tempo di ritenzione, ad ogni picco sarà associato uno spettro di massa, che rappresenta il “finger print” di uno specifico monosaccaride; l'area sottesa ai picchi è proporzionale alla quantità di monosaccaridi presenti nella miscela, quindi si possono valutare i rapporti molari dei monosi dell'unità ripetitiva.

In figura 10 è riportato lo spettro del metile- $\beta$ -D-glucoside acetilato, ottenuto alla GC-MS.

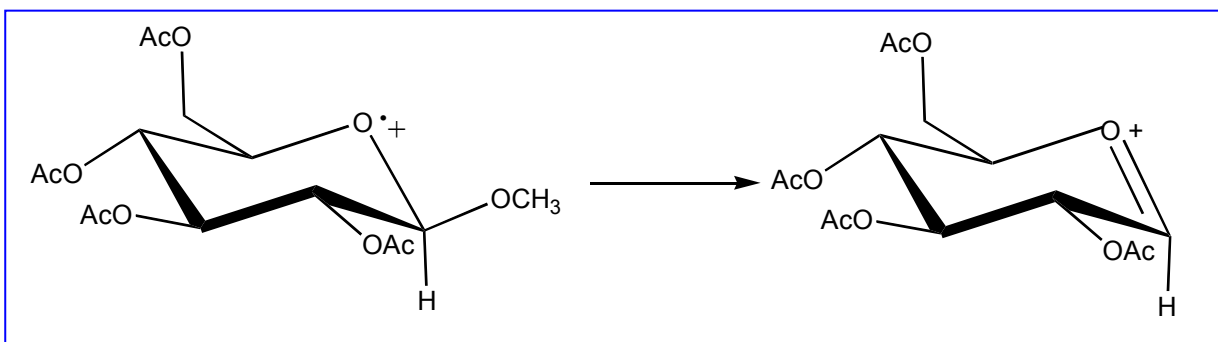


**Figura 10:** Spettro di massa del metil  $\beta$ -D-glucoside acetilato.

Come già accennato precedentemente, lo spettro è ottenuto mediante ionizzazione elettronica (EI), che essendo un tipo di ionizzazione ad energia piuttosto elevata (70 eV), provoca una sostanziale frammentazione della sostanza eluita dalla colonna capillare.

Negli spettri di queste sostanze, non è possibile, infatti, individuare il segnale dello ione molecolare  $M^+$ , ma solo i segnali di ioni frammento.

In figura 11 si può osservare la frammentazione che porta alla formazione dello ione ossonio ( $A_1^+$ ), che quando è presente fornisce indicazioni sul tipo di monosaccaride.



**Figura 11:** *Formazione dello ione ossonio.*

In ogni caso, il cromatogramma che si ottiene, presenta più picchi per ogni monosaccaride, il che è dovuto alla formazione di derivati anomericici  $\alpha$  o  $\beta$ , sia in forma piranica che furanica.

Diversamente il metodo degli alditoli acetilati (AA) ha il vantaggio di fornirci un unico segnale per ogni monoso, in quanto con lo step di riduzione si elimina la chiralità del carbonio anomero. La riduzione è effettuata con  $\text{NaBH}_4$  sul prodotto dell'idrolisi e, dopo peracetilazione, si ottiene una miscela di alditoli peracetilati che, all'analisi GC-MS, danno un unico segnale per ogni monosaccaride. Con tale procedura, però, non vengono visualizzati gli acidi uronici, a differenza del metodo degli MGA, poichè facilmente decarbossilano in ambiente acido. Anche qui i monosaccaridi vengono riconosciuti in base al loro caratteristico pattern di frammentazione

La metanolisi permette di derivatizzare anche la parte lipidica del polimero; gli acidi grassi, isolati come metil esteri, successivamente alla metanolisi, tramite estrazione metanolo/esano, sono rivelati alla GC-MS.



## 2.7. Determinazione della configurazione assoluta dei monosaccaridi

L'identificazione della configurazione assoluta dei monosaccaridi può essere realizzata seguendo diverse procedure.

Il metodo classico è quello che prevede la misura del potere rotatorio specifico dei singoli monosi, ottenuti in seguito ad idrolisi totale del poli/oligosaccaride e separati con cromatografia preparativa. Difficilmente, però, questa procedura può essere applicata nei nostri studi, in quanto richiede quantità non trascurabili (svariati milligrammi) di ciascun monosaccaride ad elevato grado di purezza.

Diversamente, si possono effettuare misure di dicroismo circolare dei monosi perbenzoilati [24], ma è comunque una procedura che richiede la disponibilità di campione nell'ordine dei milligrammi.

Nel caso in cui si ha a disposizione una quantità esigua di materiale, un metodo sensibile è quello basato sull'analisi gascromatografica dei monosi derivatizzati per reazione con alcoli chirali (*R/S* 2-ottanolo o 2-butanolo) in forma enantiomericamente pura in ambiente acido e successivamente acetilati [25].

A seconda della configurazione D o L del residuo si ottengono due differenti derivati diastereoisomerici con un diverso tempo di ritenzione sulla colonna capillare. Questi ultimi vengono poi confrontati con quelli di standard, appositamente preparati.

## 2.8. Determinazione delle posizioni dei legami interglicosidici

La posizione dei legami glicosidici è determinata con metodi chimici, quali la metilazione esauriente, la degradazione ossidativa di Smith ed attraverso esperimenti NMR.

La metilazione è basata sulla conversione completa ad eteri metilici di tutti gli ossidrili liberi del poli/oligosaccaride, cioè di quelli non coinvolti nella formazione dell'anello, nella formazione di legami glicosidici inter-residuo, nel legame con sostituenti.

Le condizioni di reazione molto basiche, richieste per la metilazione, non sono dannose per i legami glicosidici, poiché, questi risultano essere stabili in tali condizioni.

La successiva idrolisi acida lascia intatti gli eteri metilici, liberando le posizioni impegnate nei legami inter-residuo. La posizione 1 degli O-metil derivati, così ottenuti, è ridotta con NaBD<sub>4</sub>, l'uso di un reagente deuterato serve per marcare la posizione 1 e distinguerla dal gruppo alcolico eventualmente presente in posizione 6. A questo punto, tutti gli ossidrili liberi, precedentemente impegnati in legami, sono acetilati e la miscela di alditoli acetati parzialmente metilati (AAPM) è sottoposta ad analisi mediante GC-MS.

Dal tipo di frammentazione che ogni AAPM mostra è possibile distinguere le sue posizioni acetilate da quelle metilate, ed identificare così quelle coinvolte nei legami interglicosidici del monosaccaride da cui deriva.

La reazione di permetilazione, eseguita con il metodo di Hakomori [26,27] modificato da Sandford e Conrad [28], consiste nel far reagire il polisaccaride con ioduro di metile in presenza di dimetilsulfinilcarbanione, ottenuto dal dimetilsolfossido per reazione con idruro di potassio.

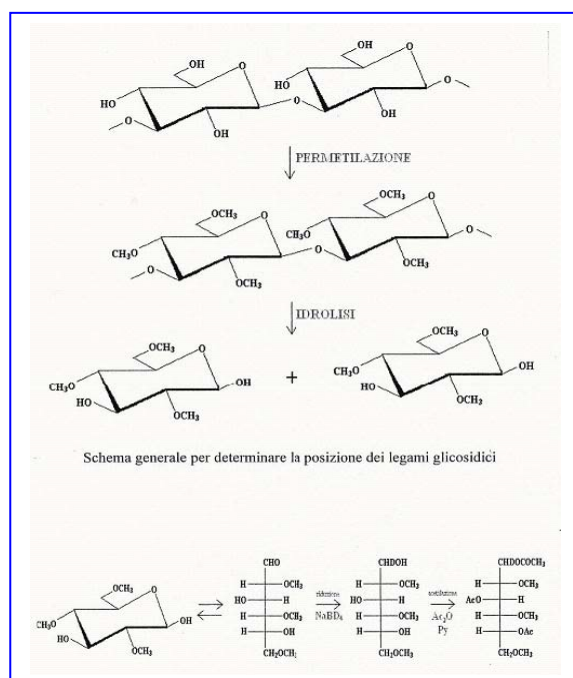
Per la permetilazione di campioni oligosaccaridici un metodo più rapido e valido è quello Ciucanu, che prevede l'uso di NaOH [29]. Il campione, ben essiccato, è sciolto in DMSO anidro e alla soluzione risultante è aggiunto NaOH finemente suddiviso; successivamente, a freddo, esso è fatto reagire con ioduro di metile.

L'esito positivo della reazione di metilazione dipende da diversi fattori. I gruppi ossidrilici devono essere ben ionizzati affinché ci sia sostituzione nucleofila sull'agente

metilante. Questo è assicurato dall'uso di un eccesso di carbanione, la cui presenza è controllata col saggio del trifenilmetano (il trifenilmetano dà una colorazione rossa per reazione con il carbanione). Determinanti sono anche l'anidricità e la completa dissoluzione del campione nel DMSO.

Per assicurare una completa metilazione occorre a volte reiterare il processo. Inoltre, è necessario scegliere le condizioni d'idrolisi migliori secondo la natura dei monosi, affinché si scindano tutti i legami glicosidici, senza perdite in sottoprodotti dovuti alla degradazione.

Si osserva che, nel caso di poli/oligosaccaridi acidi, è conveniente ridurre il gruppo carbossilico prima di analizzare il derivato AAPM. Infatti, il legame a livello del Kdo è identificato attraverso la riduzione del gruppo carbossimetilico del prodotto permetilato con una soluzione 1 M di litiotrietilborodeuteruro in THF, seguita da un'idrolisi blanda (TFA 0.1 M a 100 °C per 30 minuti) per rompere il legame chetosidico, dalla riduzione con NaBD<sub>4</sub>, dall'idrolisi totale della catena (TFA 2 M a 121°C per 2 ore) ed infine dalla conversione di AAPM [30]. Quando nella catena sono presenti amminozuccheri questi vengono metilati anche sull'atomo di azoto [31].



**Figura 12:** Schema generale per la formazione di un AAPM.

Ciascun monoso, così derivatizzato, avrà una particolare propensione a frammentarsi in alcuni punti precisi, a seconda delle posizioni originariamente coinvolte nei legami glicosidici ed ora acetilate.

Come già detto precedentemente, l'utilizzo più importante della GC-MS nell'analisi della struttura di poli-oligosaccaridi, risiede nello studio delle miscele di alditoli acetati parzialmente metilati da essi derivate. Il riconoscimento delle posizioni acetilate è di importanza fondamentale poiché permette di identificare sia punti d'attacco di un monoso che la sua natura furanosa o piranosica.

La GC-MS ha un duplice vantaggio poiché risolvendo la miscela di alditoli acetati parzialmente metilati nei picchi del cromatogramma e fornendo lo spettro di massa di ciascuno di essi, ne permette l'identificazione.[32,33]

Per determinare la posizione dei gruppi metilici e acetilici, bisogna tener conto delle seguenti regole:

- i frammenti primari si formano dalla rottura dello scheletro carbonioso dell'alditolo.

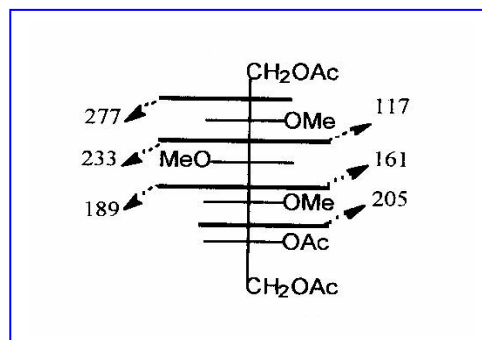
- la carica risiede sempre sul frammento che ha l'atomo di carbonio legato ad un metossile ed adiacente al punto in cui si frammenta lo scheletro.

- la frammentazione tra due atomi di carbonio che legano metossili è favorita rispetto a quella tra due carboni recanti l'uno un metossile e l'altro un acetile, a sua volta favorita rispetto a quella tra due carboni leganti due gruppi acetilici.

- un gruppo N-metilacetammidico promuove la scissione tra l'atomo di carbonio che lo lega ed un atomo di carbonio adiacente legato ad un metossile o ad un acetile, in entrambi i casi la carica positiva è stabilizzata sulla funzione N-metilacetammidica.

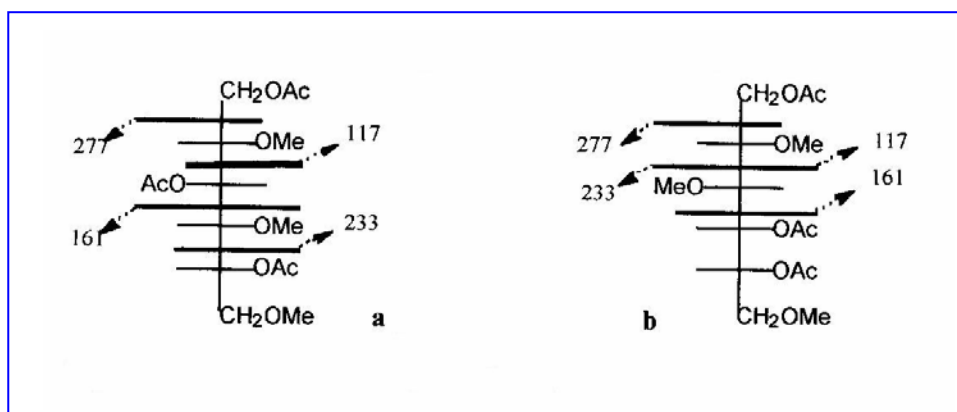
- ioni dovuti ad una frammentazione secondaria sono prodotti dalla perdita di metanolo o acido acetico. Queste eliminazioni, sono osservate solo quando il metossile o l'acetossile sono in  $\beta$  rispetto all'atomo di carbonio che porta la carica formale o in  $\beta$  ad un carbonile.

Queste regole sono illustrate per il 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metil-glucitolo che identifica un residuo di glucosio piranico 6-legato (fig 13):



**Figura 13:** Frammentazioni tipiche di un Glc 6-legato.

In alcuni casi si può osservare la stessa serie di frammenti per due diversi punti di attacco, come per il 1,3,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitolo ed il 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitolo indicanti rispettivamente la presenza di un glucosio 3-legato ed uno 4-legato (fig 14):



**Figura 14:** Frammentazioni tipiche di un Glc 3-legato (a) e di un Glc 4-legato (b).

Questo problema può essere risolto introducendo un atomo di deuterio sull'atomo di carbonio 1, utilizzando il  $\text{NaBD}_4$  per la riduzione del gruppo aldeidico. In questo caso lo ione frammento che contiene l'atomo di carbonio 1 ha un rapporto  $m/z$  pari, laddove in quello che non lo contiene il rapporto è dispari.

Il metodo più usato per determinare la stereochimica degli alditoli acetati parzialmente metilati consiste nel confronto tra i tempi di ritenzione al gascromatografo degli alditoli provenienti dal polisaccaride ed una miscela di campioni standard appositamente sintetizzati [34]. I rapporti quantitativi tra gli alditoli acetati parzialmente metilati sono calcolati usando i fattori di risposta riportati in letteratura [35].

In alcuni casi, quando l'intensità dei picchi è bassa tale da perdersi nel rumore di fondo, è possibile operare con il metodo SIM (Selective Ion Monitoring).

Esso consiste nel selezionare le masse relative ai frammenti che caratterizzano le diverse classi dei monosi che si vogliono cercare, il cromatogramma mostrerà gli spettri relativi ai campioni contenenti i frammenti selezionati. In tal caso si ottiene, però, solo un'analisi qualitativa.

Con la spettroscopia NMR l'identificazione dei punti d'attacco si basa sulle variazioni significative di schermatura magnetica dei carboni  $^{13}\text{C}$  impegnati nei legami glicosidici rispetto ai corrispondenti monosaccaridi non legati. Quello che accade è che i chemical shifts di carboni impegnati nei legami subiscono uno spostamento a campi bassi di 8-10 ppm (glycosylation shift), mentre i carboni adiacenti subiscono uno shift a campi alti di 1-3 ppm, rispetto ai valori del monoso. Utili sono anche gli esperimenti NOE mono e bi-dimensionali.

## 2.9. Determinazione delle dimensioni dell'anello

Per stabilire la dimensione dell'anello dei monosaccaridi si può ricorrere alla GC-MS. Infatti, un AAPM originato da un monoso in forma piranica è diverso da quello originato da un monoso in forma furanica, esso, cioè, ha un diverso pattern di frammentazione ed un diverso tempo di ritenzione. Infatti, se un monoso è in forma furanica il suo derivato metilato ed acetilato avrà la posizione 4 acetilata, invece se è in forma piranica avrebbe la posizione 4-*O*-metilata e la posizione 5 acetilata.

Se sia la posizione 4 che la 5 sono acetilate, è impossibile stabilire attraverso la GC-MS la forma piranica o furanica. In questo caso risulta utile un'analisi  $^{13}\text{C}$  NMR, poiché i carboni anomerici dei residui furanici risuonano a campi più bassi (106-109  $\delta$ ) dei corrispondenti residui piranici (95-103  $\delta$ ), per cui dal valore del chemical shift e dal confronto con valori di letteratura si può risalire alle dimensioni dell'anello. Anche i chemical shift dei protoni anomerici sono sensibili alle dimensioni del ciclo, ma sono meno affidabili, in quanto sensibili ad alcuni parametri esterni, quali temperatura solvente etc..

## 2.10. Determinazione della configurazione dei centri anomeric

L'analisi della configurazione ( $\alpha$  o  $\beta$ ) dei carboni anomeric dei singoli residui può essere determinata attraverso la spettroscopia  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR. Infatti, il chemical shift di H-1 e C-1 di un residuo glicosidico in un poli/oligosaccaride è relazionato alla sua configurazione ed alla sua conformazione.

Talvolta, però, si verificano variazioni di chemical shift così elevate da far risuonare il segnale di un anomero nell'intervallo di chemical shifts di un altro, oppure le differenze di  $\delta$  di C-1 e H-1 sono talmente minime che non è possibile una giusta valutazione.

In questi casi è indispensabile una valutazione delle costanti di accoppiamento  $^3J_{\text{H,H}}$ , lette nello spettro protonico 1D, e quelle eteronucleari  $^1J_{\text{C,H}}$ , ricavate da esperimenti di DEPT accoppiato. Negli aldosi il valore delle costanti  $^3J_{\text{H,H}}$  è di 7-9 Hz per i  $\beta$ -anomeri e di 2-3 Hz per gli  $\alpha$ -anomeri, mentre il valore delle  $^1J_{\text{C,H}}$  è di circa 160 Hz per la configurazione  $\beta$  e 170 per quella  $\alpha$ .



## 2.11. Determinazione della sequenza dei residui glicosidici

Per poter risalire all'ordine con cui le unità monosaccaridiche sono disposte in una catena, occorre sottoporre il poli/oligosaccaride ad una degradazione chimica ed analizzare i prodotti di tale reazione, opportunamente separati tra loro con metodi cromatografici chimici e spettroscopici.

La spettrometria di massa è senz'altro una tecnica fondamentale, ed in alcuni casi determinante, per ottenere la sequenza di un oligosaccaride. In particolare, l'impiego di tecniche di ionizzazione per bombardamento con atomi veloci (FAB) permette di ottenere caratteristici patterns di frammentazione, in cui sono individuabili tutta una serie di segnali, corrispondenti alla reiterata perdita di un residuo saccaridico dall'oligomero, di cui è comunque presente il picco dello ione molecolare. Oggi con tecniche di ionizzazioni più soft, quali MALDI ed ESI, e mediante l'utilizzo di analizzatori di ioni più sofisticati, è possibile ottenere dettagliate informazioni sulla sequenza di un oligosaccaride.

Per lo studio di oligosaccaridi a basso peso molecolare (2-3 residui) la GC-MS è sicuramente la tecnica da preferire per la relativa rapidità di analisi, la semplicità della strumentazione e per le informazioni addizionali che si traggono da frammentazioni secondarie, indotte dalla maggiore energia coinvolta nella ionizzazione ad impatto elettronico.

L'analisi dei frammenti, ottenuti dalla spettrometria, di massa è supportata dall'analisi spettroscopica 1D e 2D  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR.

La possibilità di disporre di elettromagneti sempre più potenti e di sofisticati software di gestione del FID ha permesso di affrontare lo studio della sequenza di poli/oligosaccaridi con l'utilizzo di tecniche 2D-NMR. Particolarmente utili a tale scopo sono esperimenti di correlazione omo ed eteronucleare, tipo COSY e HSQC rispettivamente, che permettono un'attribuzione molto spesso puntuale di tutte le risonanze dei protoni e dei carboni presenti all'interno di ciascun residuo monosaccaridico della macromolecola. Queste informazioni sono poi la base da cui derivare tutta una serie di correlazioni spaziali di tipo NOE (spettri NOESY) e scalari di tipo "long range" (spettri HMBC), tali da caratterizzare univocamente il poli/oligosaccaride.

## 2.12. METODI SPETTROSCOPICI E SPETTROMETRICI

### 2.12.1. Risonanza magnetica nucleare (NMR)

Con la spettroscopia NMR ci si trova di fronte alla principale tecnica analitica per l'indagine strutturale di poli/oligosaccaridi, tecnica con cui si rende possibile formulare ipotesi di struttura, oltre che confermare i risultati ottenuti con altri metodi analitici.

Indipendentemente, infatti, dalle dimensioni e dalla complessità di una catena poli e oligosaccaridica è possibile attraverso l'ausilio incrociato di tecniche NMR  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mono e bidimensionali formulare, comunque, un'ipotesi plausibile di struttura primaria.

In questi ultimi anni, le tecniche spettroscopiche si sono guadagnate il ruolo di strumento principe nella caratterizzazione strutturale di macromolecole, e principalmente dei carboidrati.

I lipopolisaccaridi, però, non sempre offrono buoni spettri, in quanto essendo macromolecole, sono caratterizzati in soluzione da una mobilità non uniforme e particolarmente bassa in alcune zone, comportando valori del tempo di rilassamento  $T_2$  molto brevi che originano segnali molto larghi e spettri non ben risolti, di difficile interpretazione.

Infatti i lipopolisaccaridi adottano in soluzione acquosa una struttura micellare: le catene lipidiche, allo scopo di minimizzare le interazioni con l'acqua, vengono a trovarsi all'interno della micella, mentre all'esterno si affacciano i residui zuccherini. I residui nelle immediate vicinanze del layer lipidico hanno tempi di rilassamento molto piccoli poiché "ancorati" ad un'estremità pressoché immobile nell'intera struttura tridimensionale. Questi ultimi, sono quindi virtualmente trasparenti all'NMR.

Alcuni accorgimenti possono essere adottati per migliorare la risoluzione dello spettro come l'uso di elettroliti inerti o l'esecuzione degli esperimenti NMR ad alta temperatura ( $50^\circ\text{-}70^\circ\text{C}$ ), senza dimenticare la possibilità di eventuali alterazioni del polisaccaride stesso.

In genere si preferisce lavorare sul campione de-O-acilato poiché presenta caratteristiche migliori rispetto a quelle del prodotto nativo per via della sua migliore solubilità, inoltre la procedura di de-O-acilazione è realizzata in condizioni blande

restituendo una molecola molto prossima a quella originale senza introdurre nessun artefatto.

Registrandosi normali spettri NMR monodimensionali di  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  si possono ottenere dei primi indizi circa il numero e la natura dei monosi costituenti la catena saccaridica, sulle dimensioni degli anelli (furanosici o piranosici), sulla configurazione  $\alpha$  o  $\beta$  dei centri anomerici, semplicemente osservando la regione dello spettro protonico compresa fra  $\delta$  5.5-4.2, dove risuonano i protoni anomerici e la porzione di spettro di  $^{13}\text{C}$  fra 102-90 ppm, ove sono presenti i segnali dei carboni anomerici.

Per questa via è possibile, inoltre, diagnosticare l'eventuale presenza di monosi peculiari.

Lo spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR di un polisaccaride può essere suddiviso in cinque zone principali:

- Una a basso campo, intorno a 170-185 ppm, in cui ricadono i segnali dei carboni carbossilici degli acidi uronici, del Kdo e gruppi carbonilici di sistemi esterei o ammidici.
- Nella regione a valori di  $\delta$  tra 111 e 95 cadono i segnali dei carboni anomerici legati ( $\text{C}_\beta$  risuonano a  $\delta$  più alti del  $\text{C}_\alpha$ ).
- Nella zona tra 80 e 60 ppm risuonano i carboni ossimetilici o carbinolici.
- Nell'intervallo tra 60 e 45 ppm cadono i segnali dei carboni legati ad atomi d'azoto.
- La zona intorno a 30 ppm è invece peculiare di metileni alifatici, nel caso di deossizuccheri.
- Nella regione tra 20 e 17 ppm risuonano i carboni metilici dei 6-deossizuccheri e degli acetili.

Un fenomeno importante da considerare nella lettura degli spettri è lo “shift di glicosilazione” (glycosylation shift). Sperimentalmente si è osservato che, quando un monosaccaride è impegnato in un legame glicosidico, i chemical shifts dei carboni implicati nel legame subiscono uno spostamento a campi bassi fino a 8-10 ppm, mentre i carboni adiacenti al sito di glicosilazione subiscono uno shift a campi alti dell'ordine di 1-3 ppm rispetto ai valori di chemical shift dei carboni del monosaccaride non legato. Dalla valutazione, inoltre, della “glycosylation shift” è possibile identificare i carboni coinvolti nel legame glicosidico per confronto con i valori di chemical shifts

delle unità legate con quelli di metilglicosidi di riferimento, stabilendo i punti di attacco.

Dal valore di chemical shift e/o dal valore della costante di accoppiamento  $^1J_{C,H}$  del carbonio anomero, inoltre, si possono avere informazioni non solo sulla natura del legame glicosidico ma anche sulle dimensioni d'anello, furanico o piranico, del monoso.

Talvolta, però, si verificano variazioni di chemical shift così elevate da far risuonare il segnale di un anomero nell'intervallo di chemical shifts di un altro, oppure le differenze di  $\delta$  di C-1 e H-1 sono talmente minime che non è possibile una giusta valutazione. In questi casi è indispensabile una valutazione delle costanti di accoppiamento  $^3J_{H,H}$ , lette nello spettro protonico 1D, e quelle eteronucleari  $^1J_{C,H}$ , ricavate da esperimenti di DEPT accoppiato.

Negli aldosi il valore delle costanti  $^3J_{H,H}$  è di 7-9 Hz per i  $\beta$ -anomeri e di 2-3 Hz per gli  $\alpha$ -anomeri, mentre il valore delle  $^1J_{C,H}$  è di circa 160Hz per la configurazione  $\beta$  e 170 per quella  $\alpha$ .

Gli spettri  $^1H$  dei polisaccaridi presentano gli stessi inconvenienti di quelli del  $^{13}C$ , ma in misura maggiore. I fattori che influenzano la risoluzione degli spettri protonici sono:

- segnali larghi e poco risolti a causa dei piccoli tempi di rilassamento;
- intervallo limitato in cui risuonano i protoni degli zuccheri;
- nella regione anomera ricade il segnale intenso del solvente HOD.

Quest'ultimo fattore presenta lo svantaggio che alcuni protoni anomericici possono non essere valutati perché coperti dal segnale dell'HOD. Tale difficoltà è superabile, però, registrando spettri a temperature più elevate, favorendo così lo spostamento del segnale del solvente a campi più alti, oppure eseguendo esperimenti NMR che consentono la soppressione del segnale, con lo svantaggio però, di avere la perdita di tutti i segnali molto vicini a quelli dell'HOD.

La zona più studiata è quella in cui cadono i protoni anomericici perché, come accennato prima, i valori di chemical shift sono indicativi sia della forma in cui lo zucchero è presente, furanica o piranica, sia della configurazione della posizione anomera mentre, dal valore della costante di accoppiamento vicinale del protone anomero, è possibile stabilire la natura  $\alpha$  o  $\beta$  del centro anomero.

La restante zona dello spettro ha scarsa importanza pratica in quanto poco chiara a causa dell'elevato numero di segnali, ad eccezione di quella a campi alti in cui sono identificabili i segnali dei deossizuccheri.

Le informazioni così ricavate sono comunque insufficienti per formulare una ipotesi di struttura primaria. È attraverso esperimenti monodimensionali particolari, quali TOCSY 1D, DEPT e mediante l'ausilio della spettroscopia 2D di correlazione, sia omonucleare, quali COSY e TOCSY, che esperimenti eteronucleari sia diretti sia long range, HMQC, HMBC, che si può confermare o confutare quanto ricavato in prima istanza dall'analisi spettroscopica "introduttiva".

### 2.12.1.2. Risonanza magnetica nucleare bidimensionale

Nella spettroscopia NMR bidimensionale si rappresenta l'intensità del segnale in funzione di due frequenze, relative ad un unico tipo di nucleo o a nuclei differenti.

Lo spettro viene visualizzato tagliando il diagramma tridimensionale con curve di livello, evidenziando, così, segnali diagonali e i cosiddetti "cross-peaks".

Gli esperimenti si basano sull'invio al campione di più sequenze di impulsi, articolate in quattro fasi fondamentali: preparazione, evoluzione, mixing time e rivelazione. Di queste, il tempo di evoluzione viene incrementato di volta in volta di un'unità  $\Delta$  costante, acquisendo una serie di spettri monodimensionali che, trasformati, restituiscono il grafico bidimensionale.

Il principio fisico su cui si basa la maggior parte delle tecniche 2D-NMR è l'accoppiamento scalare, che si manifesta nella costante  $J$ , relativa all'interazione omonucleare ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) ed eteronucleare ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ ), ma si possono mettere in evidenza anche altri fenomeni, come quello dell'accoppiamento dipolare, che dà vita all'Effetto Nucleare Overhauser (NOE).

Tra gli esperimenti che evidenziano correlazioni scalari, hanno particolare importanza COSY, TOCSY, HSQC e HMBC, mentre tra le tecniche volte a rivelare interazioni dipolari, consideriamo NOESY e ROESY.

#### ◆ COSY (Correlation Spectroscopy)

In uno spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY si evidenziano accoppiamenti scalari omonucleari tra protoni vicinali e geminali all'interno della molecola.

Lo spettro protonico monodimensionale appare lungo la diagonale, esterni alla diagonale ci sono i cross peaks, disposti simmetricamente su entrambi i lati rispetto a questa. Questi ultimi costituiscono diretta evidenza dell'esistenza di accoppiamento scalare tra i due protoni.

#### ◆ TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)

Con questa tecnica spettroscopica si evidenziano correlazioni tra protoni appartenenti allo stesso sistema di spin, anche se non tutti direttamente accoppiati scalarmente tra loro.

La magnetizzazione si propaga lungo tutta la catena, e questo consente di stabilire l'appartenenza di un dato nucleo ad uno specifico residuo monosaccaridico.

Un TOCSY, analogamente al COSY, presenta lo spettro monodimensionale lungo la diagonale e, in genere, più di un cross peak per ogni protone esternamente e simmetricamente disposti rispetto alla diagonale.

E' possibile ottenere una mappa delle correlazioni che ciascun nucleo presenta con gli altri nuclei e costruire, avvalendosi del COSY, lo scheletro della catena.

### ◆ **HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)**

Nella spettroscopia di eterocorrelazione si mettono in evidenza gli accoppiamenti scalari geminali tra  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , o  $^{31}\text{P}$  e  $^1\text{H}$ .

L'esperimento è progettato tenendo conto dei valori medi delle  $J$  per il caso specifico in esame. Negli spettri si avranno sulle due dimensioni rispettivamente le frequenze di risonanza del protone e dell' eteronucleo correlato, e pertanto sarà assente la diagonale.

### ◆ **HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)**

Con questa tecnica spettroscopica si evidenziano correlazioni scalari long-range tra protoni e carboni distanti 2 o 3 legami. Per questo motivo, la tecnica HMBC risulta particolarmente utile per stabilire la sequenza dei residui in una catena oligo o polisaccaridica.

### ◆ **NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)**

È una tecnica che mostra accoppiamenti dipolari tra nuclei che, per effetti conformazionali e di prossimità, distano meno di  $5\text{\AA}$ . I cross-peaks pertanto rivelano questo tipo di interazioni e sono visibili anche tra protoni che non appartengono allo stesso residuo monosaccaridico. Ciò permette di confermare la sequenza dei residui nella catena stabilita attraverso esperimenti HMBC.

### ◆ **ROESY (Rotating frame NOE Spectroscopy)**

È una tecnica analoga al NOESY, utilizzata prevalentemente per molecole di media grandezza.

In uno spettro ROESY si osserveranno picchi sia in fase che in antifase rispetto alla diagonale: i primi sono dovuti ad interazioni scalari e sono assimilabili ad uno spettro TOCSY, i secondi derivano dalle interazioni dipolari.



### 2.12.2. Spettrometria di massa MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)

La Spettrometria di massa MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) si basa sul desorbimento e la ionizzazione di specie chimiche mediante irraggiamento con impulsi laser ed è utile nella caratterizzazione strutturale di molecole biologiche quali peptidi, oligonucleotidi, glicolipidi, glicoproteine e polisaccaridi senza derivatizzazione.

I campioni vengono fatti cristallizzare con una matrice solida cromofora costituita da composti aromatici a basso peso molecolare, che assorbono energia dal laser. La matrice gioca un ruolo fondamentale per la risoluzione degli spettri: mediando infatti l'energia del laser, impedisce che le molecole producano frammenti e permette di isolare le molecole di analita, inibendo la formazione di clusters. Il meccanismo della ionizzazione MALDI non è ancora del tutto spiegato, ma si sviluppa essenzialmente in tre punti:

- ✦ Formazione di una “soluzione solida omogenea” da parte della matrice, che isola completamente ciascuna molecola di analita.
- ✦ Assorbimento di energia dalla matrice con formazione di clusters costituiti da molecole di analita – molecole di matrice neutre ed in uno stato eccitato.
- ✦ Trasferimento di energia dalla matrice all'analita, che favorisce la transizione istantanea di entrambi nella fase gassosa, in cui avviene la ionizzazione mediante trasferimento di carica (protoni) grazie a reazioni fotochimiche.

Questo metodo permette di ottenere grandi molecole come ioni molecolari intatti o in alcuni casi come ioni molecolari alcalini  $[M+Na]^+$  se si opera in modalità positiva oppure deprotonati  $[M-H]^-$  o sottoforma di ioni molecolari radicalici  $[M]^{*-}$ , se si esegue la misura in polarità negativa. Queste reazioni di ionizzazione avvengono nei dieci nanosecondi successivi all'irraggiamento con l'impulso laser.

Gli ioni sono accelerati mediante un voltaggio di 20-30 kV ed analizzati dall'analizzatore TOF, dove sono separati in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ). L'analizzatore a tempo di volo (TOF), costituito da un tubo vuoto collegato da un lato alla sorgente e dall'altro al rivelatore, si basa sul fatto che ioni con differente rapporto

$m/z$  ed uguale energia, impiegano tempi differenti a percorrere una determinata distanza. Gli ioni formati in sorgente ricevono tutti la stessa energia cinetica dal potenziale di accelerazione ed entrano nel tubo analizzatore, dove si separano perché, avendo masse diverse, saranno dotati di velocità diverse e i più leggeri arriveranno al rivelatore prima di quelli più pesanti; pertanto il valore di  $m/z$  di uno ione è individuato dal tempo impiegato a raggiungere il rivelatore.

Le variabili da considerare in un esperimento MALDI-TOF sono:

- ⊕ Matrice (che influisce sull'altezza relativa dei picchi e sulla frammentazione)
- ⊕ Rapporto matrice-analita
- ⊕ Procedura di deposizione del campione
- ⊕ Sorgente laser
- ⊕ Lunghezza d'onda
- ⊕ Ampiezza dell'impulso
- ⊕ Possibilità di registrare sia ioni positivi che negativi

La spettrometria di massa MALDI-TOF si è rivelata, soprattutto negli ultimi tempi, uno degli approcci più utili ed innovativi per lo studio e la caratterizzazione di oligosaccaridi, anche nel caso in cui essi si trovino in miscele complesse.

Infatti nel caso specifico il MALDI è una tecnica di analisi che permette di avere informazioni sul peso delle specie molecolari e sul grado di eterogeneità della macromolecola in esame.

E' una tecnica adatta a sostanze poco volatili ed è inoltre molto soft perché l'energia in gioco non è in genere tale da provocare frammentazione della molecola in esame [36].

### 2.12.3. Spettrometria di massa con sorgente elettrospray (ESI-MS)

La spettrometria di massa ad elettrospray è una tecnica particolarmente utile grazie alle sue caratteristiche di sensibilità ed accuratezza (>0,01%).









Il campione, in soluzione, è introdotto nella camera di ionizzazione, dove alla presenza di un flusso di gas e un campo elettrico, si forma uno spray di piccole gocce di soluto carico. Grazie ad opportune differenze di potenziale, esso è spinto nell'analizzatore a quadrupolo dove gli ioni sono separati in base al loro diverso rapporto massa/carica [37]. Le specie stabili che si formano presentano una carica multipla di formula  $(M+nH)^{n+}$ , dove n rappresenta il numero di siti di protonazione, dando luogo ad una distribuzione di tipo gaussiano dei segnali lungo l'asse  $m/z$  [37]. Gli spettri di massa sono poi trasformati da un algoritmo matematico [38]. Gli spettri possono essere eseguiti sia in modalità positiva che negativa.

### 3. PARTE SPERIMENTALE, ACQUISIZIONE DATI E DISCUSSIONE

#### *HALOMONAS (DELEJA) PANTELLERIENSIS*

##### 3.1 Condizioni di crescita del batterio e procedure di estrazione del materiale lipopoli- e lipooligosaccaridico

Il brodo di coltura di crescita del batterio *Halomonas (Deleja) pantelleriensis* presenta la seguente composizione per litro di acqua:

 Estratto di lievito	10,0 g
 NaCl	100,0 g
 Na <sub>2</sub> Citrato	3,0 g
 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2-3 g
 KCl	2,0 g
 MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O (0.36 g/l)	0,0036 g
 MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
 FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O (50g/l)	0,050 g

L'Agar (2%) è mantenuto in assenza di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e sterilizzato in autoclave, quindi si aggiungono 20-30 ml di una soluzione sterile di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, in modo da ottenere un pH finale pari a 9.0.

Nella soluzione sopra descritta il batterio è lasciato crescere alla temperatura costante di 37°C per 24 ore, quindi si centrifuga per 15 minuti a 2700 rpm a 4°C, infine si liofilizza il pellet ottenuto.

Le cellule secche così ottenute sono state estratte dapprima con il metodo del PCP, per recuperare materiale lipooligosaccaridico, e poi, sulle cellule estratte, è stata eseguita un' ulteriore estrazione con il metodo del Fenolo/Acqua [21], per recuperare, invece, materiale lipopolisaccaridico.

Le cellule liofilizzate (16,077 g) sono trattate con 300 ml di miscela PCP, preparata secondo la procedura già descritta nel capitolo 2.

Le cellule sono sospese in tale soluzione ed omogeneizzate con Ultraturrax per 15 minuti. La sospensione è poi lasciata sotto agitazione per 1h a temperatura ambiente e centrifugata a 7000 rpm a 10 °C per 15 minuti. Il surnatante è stato recuperato e sul precipitato è stata ripetuta l'estrazione per altre due volte. I surnatanti sono stati riuniti, e, dopo allontanamento del cloroformio e dell'etere, è stata effettuata la precipitazione del LOS mediante piccole aggiunte di acqua. Dopo centrifugazione a 7000 rpm a 26 °C per 15 min, il fenolo è stato allontanato ed il precipitato è stato lavato con fenolo acquoso all'80% per due volte ed un'ultima volta con acetone.

Dopo ridissoluzione in acqua e liofilizzazione, sono stati ottenuti 5 mg della frazione lipooligosaccaridica. La resa è quindi pari allo 0,03 %.

A questo punto le cellule già trattate con la miscela PCP sono sospese in 90 ml di acqua Milli-Q a 68°C ed un uguale volume di fenolo, tenuto alla stessa temperatura, viene aggiunto alla sospensione. La miscela ottenuta è vigorosamente agitata per 30 min a 68°C. Con il successivo raffreddamento a 10°C, essa subisce una ripartizione in una fase acquosa superiore, una fase fenolica inferiore e un'interfase solida, costituita da materiale cellulare. Con successiva centrifugazione a 7000 rpm a 10°C per 45 min., si recupera la fase acquosa, mentre quella fenolica è sottoposta a due ulteriori estrazioni con acqua Milli-Q.

Le fasi acquose ottenute in ogni step di estrazione sono riunite e dializzate con tubi a cut off di 3500, contro acqua Milli-Q, per 2-3 giorni; infine sono liofilizzate. Si ottengono 716 mg di campione. In questo caso si ha una resa pari al 4.5%.

### **3.2. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio deossicolato (DOC-PAGE)**

I lipopoli/oligosaccaridi sono molecole esibenti una carica anionica conferitagli dalla presenza di peculiari gruppi funzionali nella struttura del lipide A e dell'inner core. La loro propensione, inoltre, a formare nel mezzo acquoso aggregati micellari di dimensioni notevoli e variabili, in dipendenza della loro anfifilicità, giustifica la grande variabilità di carica netta dei sistemi plurimolecolari a parità di carica costante dei singoli LPS e LOS.

Quest'aspetto è da tener in conto allorché in un'analisi elettroforetica si sottopongono le molecole aggregate ad una differenza di potenziale: esse migrano in funzione della loro densità di carica e cioè al variare della loro carica netta e delle loro dimensioni molecolari.

Per rendersi indipendenti dalle variazioni di carica delle micelle si sottopone il campione da analizzare a denaturazione: i singoli LPS/LOS liberati esibiranno, così, tutti la stessa carica, ma è una densità di carica che è funzione del loro peso molecolare, col risultato che, all'applicazione di una differenza di potenziale, le molecole mostreranno una mobilità dipendente esclusivamente dalla loro massa molecolare.

L'agente denaturante che viene usato è il sodio deossicolato: esso si complessa alla matrice lipidica del LPS/LOS conferendogli, inoltre, un'accresciuta mobilità elettroforetica con il suo gruppo carico.

L'utilizzo del DOC-PAGE nello studio degli LPS/LOS è limitato ad un uso analitico, essendo una tecnica molto sensibile. Essa, infatti, permette di rivelare quantità dell'ordine di 5 µg, e consente di dimostrare la natura smooth, rough o semirough dell'LPS/LOS eventualmente presente.

## CONDIZIONI SPERIMENTALI:

### Preparazione del supporto elettroforetico di acrilammide per il DOC-PAGE

	GEL INFERIORE (14%)	GEL SUPERIORE (4%)
TRIS 1.5M pH 8.8	1.35 ml	--
TRIS 0.5M pH 6.8	--	0.250 ml
ACRILAMMIDE 30%	2.34 ml	0.270 ml
H <sub>2</sub> O	1.38 ml	1.35 ml
TEMED	2.5 µl	2.5 µl
APS 10%	25 µl	15 µl
DOC 10%	--	100 µl
BLU DI BROMOFENOLO	--	30 µl

### Preparazione dei campioni:

Si prepara una soluzione acquosa 1mg/ml dell' LPS

Sono state prelevate diverse aliquote (per es.:4,6,8,12), che sono state diluite con un volume pari ad ¼ di sample buffer. Tale soluzione è costituita da:

❖ TRIS 1 M pH 6.8	1.75 ml
❖ DOC	0,0025g
❖ Glicerolo	204µl
❖ Blu di bromofenolo 3 %	45 µl
❖ H <sub>2</sub> O	678 µl

I campioni sono stati tenuti a 100 °C per 5 minuti, centrifugati a 3000 giri per altri 5 minuti, e caricati nei pozzetti del gel.

La corsa è stata condotta ad un potenziale costante di 30mA ed è stata interrotta all'arrivo del marker blu al fronte del gel.

Il tampone di corsa utilizzato è quello qui riportato:

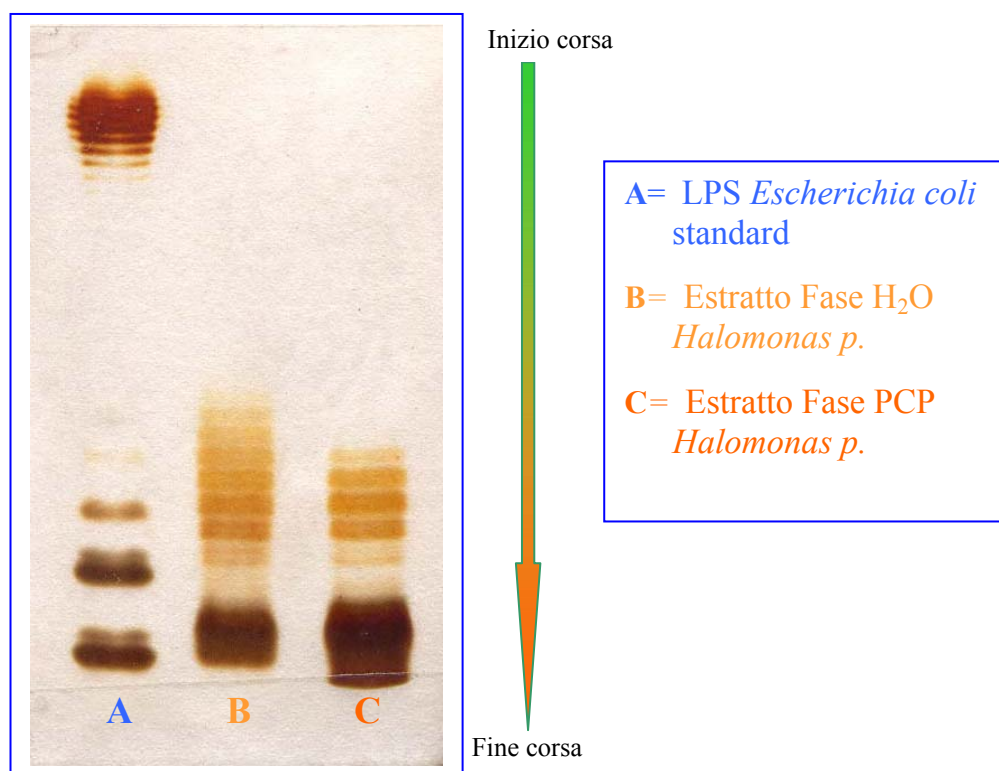
⊕DOC	2,5g/l
⊕Glicina	14,4 g/l
⊕TRIS	3,0g/l

### Colorazione del gel per carboidrati-Silver Staining

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato tenuto per una notte in una soluzione al 40% di EtOH ed al 5% di AcOH glaciale.

Esso è stato poi sottoposto ad una fase di ossidazione, della durata di 5 min, con una soluzione di  $\text{NaIO}_4$  (700 mg in 100 ml di EtOH 40% ed AcOH 5%). Dopo tre lavaggi con  $\text{H}_2\text{O}$ , della durata di 30 minuti ciascuno, il gel è stato trattato con una soluzione Silver Staining ( $\text{AgNO}_3$  0.1% per 30 minuti). Successivamente è stata aggiunta una soluzione di sviluppo del colore (di  $\text{HCHO}$  0.250 ml in 100 ml di una soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3%). Raggiunta l'intensità desiderata, (~ 20 min) lo sviluppo del colore è stato bloccato per trattamento con una soluzione di AcOH all'1% per 10 minuti.

Il gel è stato poi lavato abbondantemente con acqua e quindi seccato su uno strumento drygel, modello SE 1160 (fig 15).



**Figura 15:** Andamento elettroforetico.



### **Analisi della corsa elettroforetica**

Dall'analisi preliminare di questo risultato si evince, come prima cosa, che *Hp.* è un batterio semi-rough. E' possibile, infatti, osservare il pattern a gradini tipico di un LPS, così come risulta per *Escherichia coli*, usato come standard.

La corsa indica, inoltre, anche come esso si differenzi da quest'ultimo, in quanto non si sviluppa lungo tutto il gel, ma è prevalentemente concentrato al fronte; ciò suggerisce per esso un peso molecolare basso e quindi una *O*-Chain relativamente corta, composta cioè da poche unità ripetitive.

### **3.3. Elettroforesi su gel di agarosio per acidi nucleici**

Gli acidi nucleici sono molecole che posseggono carica anionica, conferitagli dalla presenza di gruppi funzionali peculiari all'interno della struttura stessa.

Quest'aspetto è da tener presente quando si effettua un'analisi elettroforetica, poiché è possibile sottoporre questi aggregati molecolari ad una differenza di potenziale.

A differenza di un LPS/LOS, non è necessario sottoporre il campione a denaturazione, quindi è possibile effettuare un'analisi elettroforetica direttamente: le strutture comprendenti acidi nucleici migreranno in base al peso molecolare e, specificamente, in base alla loro struttura quaternaria.

E' opportuno specificare che l'uso dell'agarosio nello studio degli acidi nucleici ha valore qualitativo, quale mezzo per accertarne la presenza in un estratto grezzo da cellule e verificarne la purezza.

Tale tecnica, inoltre, è utilizzata a scopo analitico dal momento che è molto sensibile, tant'è vero che permette di rilevare quantità nucleotidiche dell'ordine di 500 ng.

#### **CONDIZIONI SPERIMENTALI**

##### **Preparazione del supporto elettroforetico in agarosio**

La mobilità elettroforetica è funzione della percentuale di agarosio utilizzata nella produzione del gel, infatti, è possibile avere un parziale controllo utilizzando gel a diversa concentrazione.

Infatti, utilizzando diverse concentrazioni, è possibile ottenere una più precisa indicazione sulla percentuale di impurezze presenti nel nostro campione.

Le dosi indicate di seguito si riferiscono alla produzione di un singolo gel elettroforetico.

Si scioglie 1g d'agarosio in 100 ml di una soluzione TAE o TBE secondo le condizioni richieste; si fa sciogliere il gel a caldo e si aggiungono 5 µl di bromuro d'etidio per ogni 100 ml di soluzione.

Il bromuro di etidio serve per rilevare gli acidi nucleici poiché s'intercala tra coppie di basi e le rende visibili.

Si cola il gel, quando è ancora liquido, nella camera elettroforetica, con alla sommità il pettine e lo si lascia solidificare. Quindi, si raffredda in un bagno a ghiaccio.

#### **Proporzioni per la preparazione di gel elettroforetici di agarosio**

	<b>TAE (50 x)</b>	<b>TBE (10 x)</b>
<i>TRIS - base</i>	242 g	108 g
<b>Ac. Borico (s)</b>		55 g
<b>Ac. Acetico Glac</b>	57,1 ml	
<b>EDTA 0,5 M pH=8</b>	100 ml	40 ml

Il tampone di corsa è costituito da un litro della soluzione in cui si è sciolto l'agarosio.

#### **Preparazione del campione**

Si prepara una soluzione a concentrazione 1mg/ml di LPS, sciolto in acqua o in TE, nella stesse proporzioni riportate in tabella.

Si prelevano, generalmente, aliquote per un volume massimo di 20 µl, che si possono direttamente caricare nei pozzetti.

La corsa è effettuata ad un potenziale costante di 80/90 V, per circa un'ora.

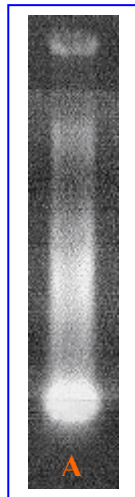
E' conveniente caricare un opportuno campione, definito "marker" costituito da basi nucleotidiche a differenti dimensioni molecolari.

#### **Visualizzazione del gel ad agarosio per nucleotidi**

Un gel di agarosio è visibile con l'ausilio di una lampada U.V., in quanto il bromuro d'etidio è visibile solo a queste lunghezze d'onda.

### Analisi di un gel di agarosio effettuato su *H p.*

L'analisi della corsa elettroforetica (fig.16) evidenzia che il campione in questione è inquinato da acidi nucleici. Tale risultato è la conferma dell' analisi eseguita mediante GC-MS su questo stesso campione che mostra in esso un elevato contenuto di ribosio.



**A= Estratto Fase H<sub>2</sub>O**  
***Halomonas p.***

**Figura 16:** *Gel di agarosio.*

### **3.4. Idrolisi enzimatica mediante nucleasi**

Tale idrolisi è necessaria per allontanare gli acidi nucleici presenti, così come evidenziato da un' elettroforesi su gel di agarosio e da un'analisi degli zuccheri del campione mediante GC-MS.

L'estratto acquoso liofilizzato è trattato a 37°C per 3 ore sotto agitazione, in presenza di RNAsi A (2mg per 40 mg di campione), sciolto in 100 ml di una soluzione di TRIS-EDTA a pH=8, costituita da EDTA in concentrazione 1mM e TRIS 10 mM; nella stessa soluzione è sciolto anche un quantitativo di MgCl<sub>2</sub> in concentrazione pari a 5 volte quella dell'EDTA.

Il campione è quindi dializzato (cut-off 3500 Da) per 3 giorni e l'interno del sacchetto di dialisi viene poi liofilizzato. Si ottengono 593mg di campione.

Per essere certi dell'assenza di acidi nucleici è stata ripetuta l' elettroforesi su gel di agarosio e l' analisi degli zuccheri.

Tali analisi hanno confermato ancora la presenza di RNA, infatti l'analisi mediante GC-MS mostra ancora un' elevato contenuto di ribosio, così come l'andamento elettroforetico.

### 3.5. Purificazione mediante cromatografia

La presenza nel campione di acidi nucleici ha reso necessario una purificazione.

Esso, quindi, è stato sottoposto ad una cromatografia su gel idrofobico Butyl Sepharose 4 fast flow (Pharmacia), usando come eluente 160 ml di acetato di sodio 0,2 M a pH=4.7 e poi 450 ml di un gradiente lineare di NaOAc : 2-PrOH (50:50 v/v) [39].

Le caratteristiche della colonna sono le seguenti:

- lunghezza=40 cm
- diametro interno=2,5 cm
- Volume=197ml
- flusso 9 ml/h
- fraz.= 2.5 ml ognuna

Le prime 29 provette sono eluite con il solo tampone acetato, le successive con il gradiente.

Il profilo cromatografico è ottenuto effettuando il saggio del fenolo (tipico per l'identificazione dei carboidrati) sulle frazioni raccolte, inoltre è stata eseguita una lettura a 260nm specifica per gli acidi nucleici.

La frazione raccolta usando il solo acetato di sodio mostra presenza di acidi nucleici, mentre nella seconda frazione, raccolta utilizzando il gradiente, gli acidi nucleici sono risultati assenti.

La frazione di interesse dopo essere stata sottoposta all' allontanamento dell'isopropanolo, viene liofilizzata. Si ottengono 145 mg di LPS.

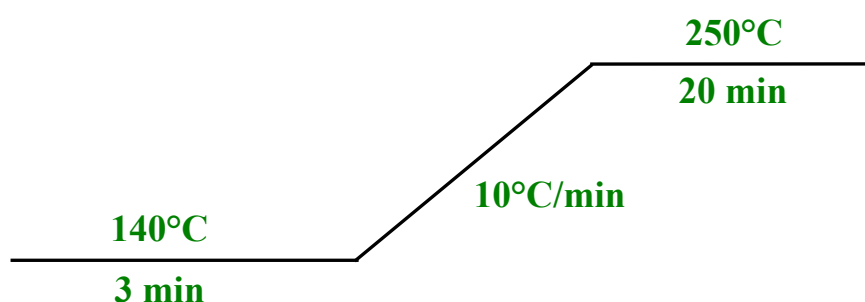
### 3.6. Metil glucosidi acetilati (MGA)

Un milligrammo del LPS grezzo è stato sciolto in 1 ml di metanolo cloridrico anidro 1 M, dopo essere stato in essiccatore sotto vuoto su  $P_2O_5$  per una notte.

La reazione di metanolisi è stata fatta procedere per 20 ore ad una temperatura di 80 °C.

Il prodotto di reazione è stato estratto 3 volte con esano allo scopo di separare i lipidi dai metil glicosidi, ed analizzarli così separatamente. La fase organica è portata a secco sotto flusso di aria, ed analizzata alla GC-MS, usando uno strumento *Hewlett Packard 5890* dotato di una colonna capillare RTX-5 (Restek, 1 30 m, d.i. 250  $\mu$ m, flusso 800  $\mu$ l/min, He come gas di trasporto).

L'analisi è stata effettuata usando il seguente gradiente di temperatura:



Dall'analisi dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici e dalla frammentazione degli spettri di massa sono stati identificati i seguenti acidi grassi:

**Tabella 4:** *Acidi grassi dell' LPS di Halomonas pantelleriensis.*

Acidi grassi	$C_{12:0}$	$C_{12:0}$
Posizioni ossidrilate		3-OH

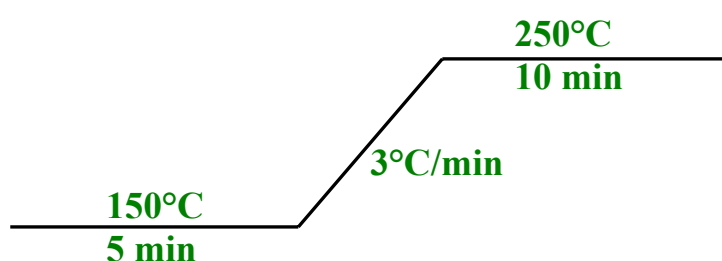
**Legenda:**  $C_{12:0}$ =acido laurico,  $C_{12:0\beta\text{-OH}}$ =acido idrossilaurico.

La fase metanolica, invece, è stata neutralizzata con  $Ag_2CO_3$  e portata a secco sotto flusso di aria, dopo aver allontanato il cloruro di argento precipitato.

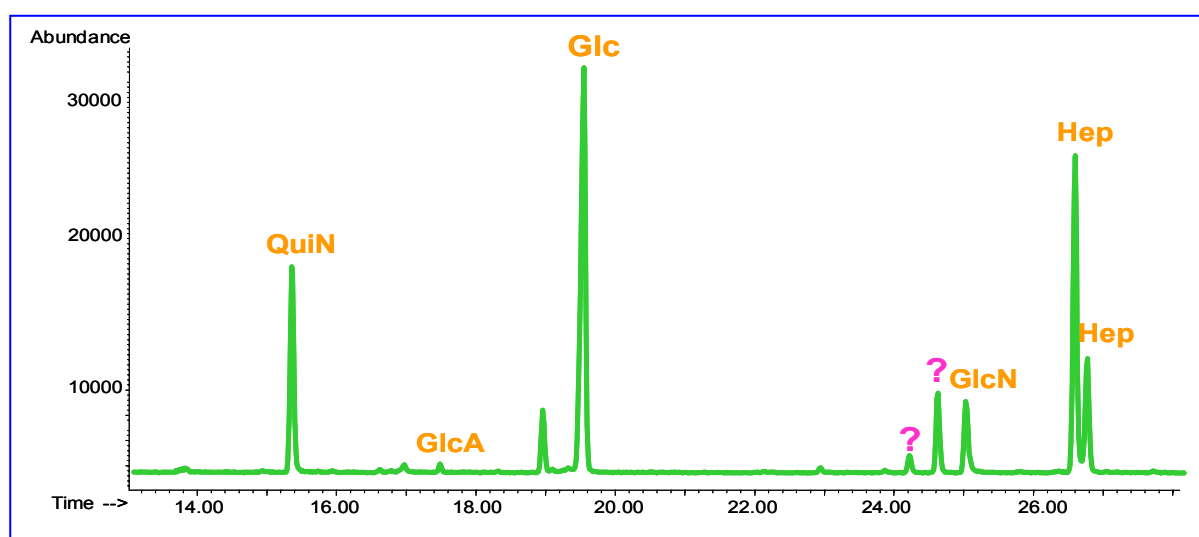
Il campione così ottenuto è stato anidrificato, per un'ora in essiccatore, e poi sottoposto ad acetilazione, con 200  $\mu$ l di piridina e 100  $\mu$ l di anidride acetica a 100 °C per 30 minuti.

Il prodotto di reazione è stato portato a secco con toluene e metanolo, allo scopo di allontanare la piridina e l'anidride acetica. A questo punto, per purificare il campione, si procede tre volte con l'estrazione con cloroformio/acqua. La fase organica, contenente gli O-metil glicosidi acetilati, è portata a secco e poi iniettata alla GC-MS.

La programmata di temperatura è di seguito riportata:



Dall'analisi dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici, confrontati con quelli standard, e dalla valutazione della frammentazione degli spettri di massa sono stati identificati i monosi costituenti la catena oligosaccaridica (fig. 17).



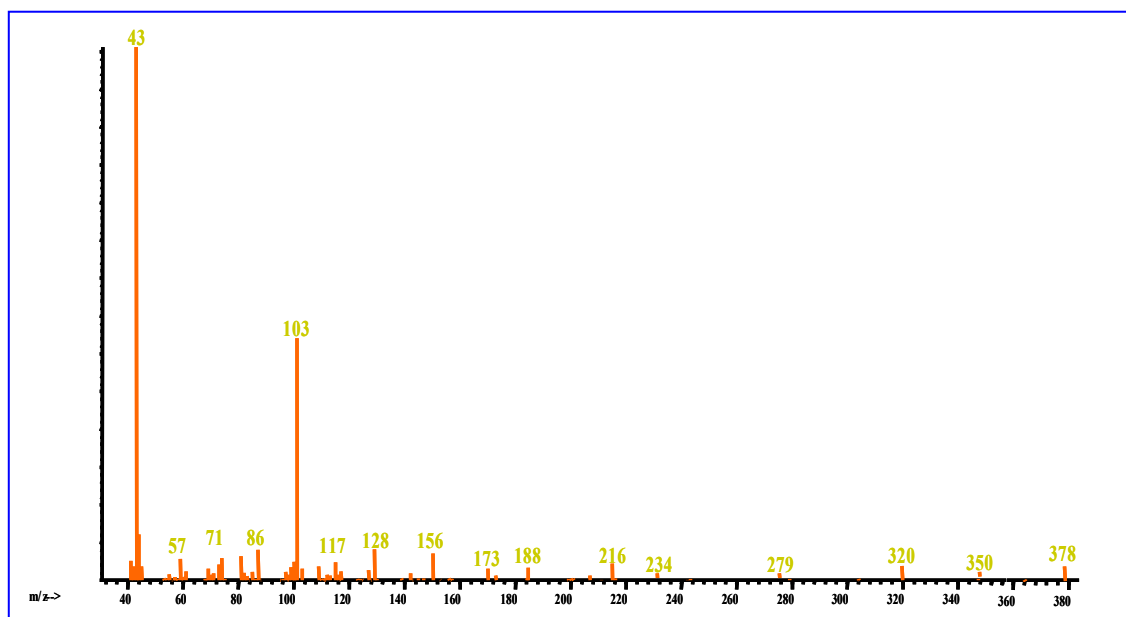
**Figura 17:** Composizione monosaccaridica di *Halomonas pantelleriensis*.

Tali monosi risultano essere: la 6-deossiglucosammina (chinovosammina), il glucosio, il 2-deossi-2-amminoglucosio (glucosammina), 2 diversi eptosi, il 2-cheto-3-deossi- D-mannottulosonico (Kdo) e tracce di acido glucuronico, inoltre nello spettro si



ritrovano due segnali le cui frammentazioni ricordano quelle degli acidi uronici, ma risultano di difficile interpretazione.

Mediante derivatizzazione di 1 mg di LPS come AA e successiva analisi degli stessi alla GC-MS è stato possibile identificare i due zuccheri: uno è l'acido 2-deossi-2-ammino-galatturonico e l'altro risulta essere l'acido 4-O-(carbossietil)-glucuronico (Fig.18).



**Figura 18:** *Analisi del AA dello zucchero inusuale mediante GC-MS.*

### 3.7. Ottenimento del materiale polisaccaridico

Per separare il Lipide A dalla porzione saccaridica, l'LPS (140mg) viene sottoposto a idrolisi con AcOH 1% (1ml/10mg di LPS) per 4h a 100°C, in presenza dello 0,1% di SDS. Queste condizioni di idrolisi acida sono specifiche e selettive in quanto riescono a scindere soltanto il debole legame glicosidico del Kdo.

La miscela di reazione viene centrifugata per 20 min. a 7000 giri/min, a temperatura ambiente.

Il precipitato formatosi rappresenta il Lipide A, mentre nel surnatante è presente la componente saccaridica (*O*-Chain)

I campioni sono poi separati e liofilizzati indipendentemente.

La porzione saccaridica, è stata separata per mezzo di cromatografia gel filtration, operando nelle seguenti condizioni:

**Fase stazionaria:** Sephacril S-300 HR (Pharmacia)

**Parametri colonna:**  $\Phi = 1.5$  cm

h = 66 cm

flusso = 17 ml/h


eluente =  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM

volume di ogni frazione 2.5ml

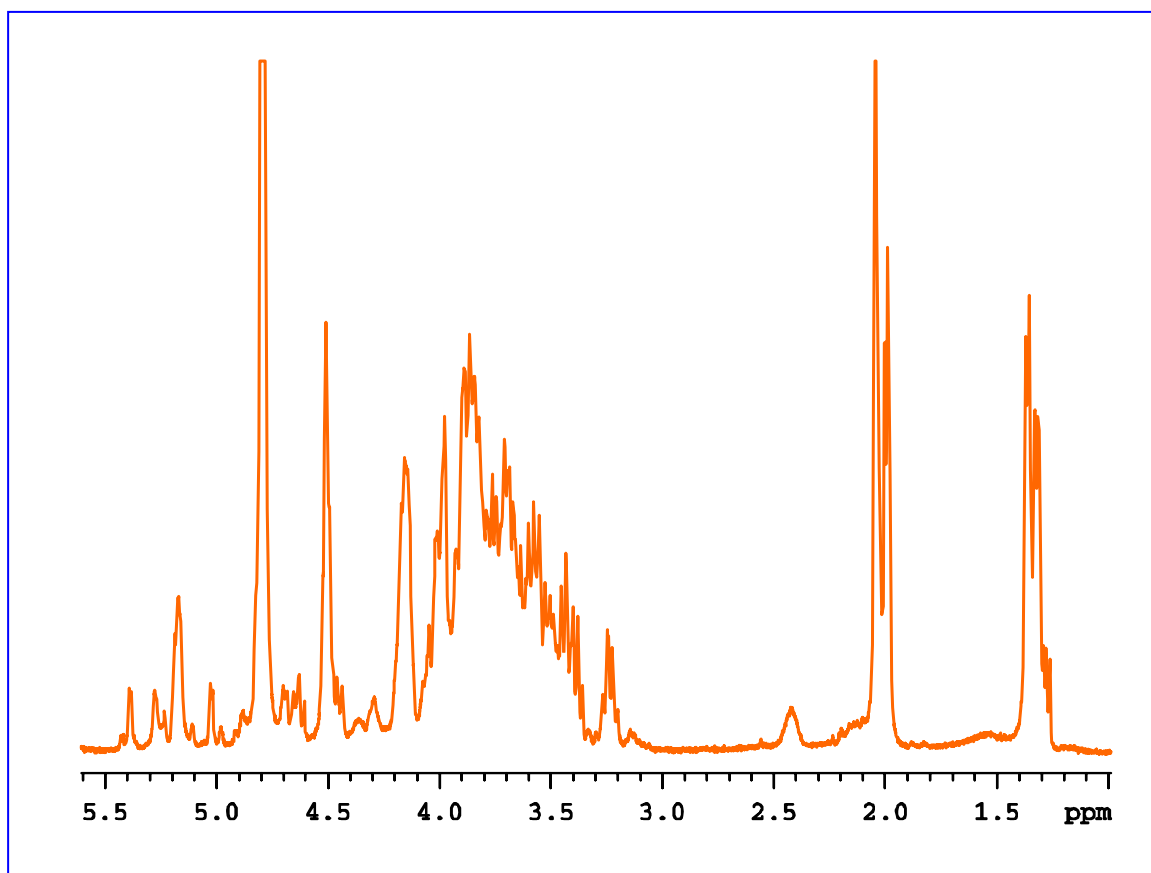
Le frazioni ottenute sono state identificate mediante spettroscopia NMR.

Le informazioni ottenute da tale analisi, sono:

 presenza di una frazione polisaccaridica = *O*-Chain (16 mg)

 presenza di una frazione oligosaccaridica = *Core* (46 mg)

In figura 19 è mostrato lo spettro protonico della frazione contenente la *O*-chain.



**Figura 19:** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR della O-chain di *Halomonas pantelleriensis*.

### 3.8. Alditoli Acetilati Parzialmente Metilati-(AAPM)

La reazione viene eseguita su un'aliquota di campione di *O*-chain (2 mg) che, anidrificata sotto vuoto con  $P_2O_5$ , per una notte, viene disciolta in 500  $\mu$ l di DMSO anidro, e lasciata in atmosfera di argon.

Quando il campione risulta ben sciolto, si aggiungono 250  $\mu$ l di potassio dimetilsulfonil carbanione 4.4 M e il tutto è lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente per 5h.

Dopo aver accertato l'eccesso di carbanione mediante il saggio del trifenilmetano, vengono aggiunti, a freddo, 300  $\mu$ l di  $CH_3I$  e il sistema è lasciato tutta la notte in agitazione a temperatura ambiente. Infine la soluzione viene dibattuta più volte con  $H_2O/CHCl_3$ , allo scopo di ottenere la fase organica, contenente i monosaccaridi permetilati, pulita da sali.

Il polimero permetilato viene ridotto con 300  $\mu$ l litiotrietilborodeuteruro ( $LiB(CH_2CH_3)_3D$ ), la miscela è quindi tenuta in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente, con tale reazione si riducono i gruppi carbossilici degli acidi uronici che altrimenti non sarebbero ridotti dal  $NaBH_4$ . Si procede quindi con l'aggiunta di  $CH_3COOH$  per distruggere l'eccesso di deuteruro, il campione è stato deionizzato su un tappo di resina Dowex 50W-X8 ( $H^+$ ), la resina è stata impaccata e lavata con EtOH al 50%. Il campione è stato quindi eluito con 3 ml dello stesso solvente, e portato a secco.

Si procede ora con l'idrolisi con 250  $\mu$ l di una soluzione di TFA 2N per 2h a  $120^\circ C$ . Dalla soluzione viene allontanato il TFA sotto flusso di aria con aggiunte di isopropanolo.

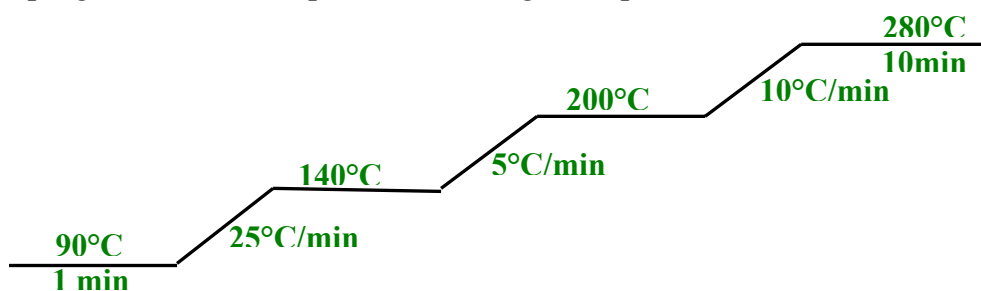
I monosaccaridi liberati vengono ridotti aggiungendo  $NaBD_4$  in EtOH (250  $\mu$ l) per 1h a temperatura ambiente.

L'eccesso di reattivo viene distrutto per aggiunta di qualche goccia di AcOH glaciale e poi seccato aggiungendo più volte metanolo.

Il prodotto, anidrificato con  $P_2O_5$  per 1h, viene acetilato con 150  $\mu$ l di piridina e 150  $\mu$ l di anidride acetica a  $120^\circ C$  per 20 min.

Il campione, seccato sotto aria, si estrae con acqua e cloroformio e, recuperata e svaporata la fase organica, viene analizzato al GC-MS.

La programmata di temperatura è di seguito riportata:



L'analisi dello spettro riportato in figura 20 mostra la presenza dei seguenti monosi:

**3-QuiN, 2-4-O-LacGlcA, 4-GlcA**

Non è stato possibile mediante questa analisi riconoscere il legame interglicosidico dell'acido galattoamminouronico, che è stato poi identificato dall'analisi degli spettri di Risonanza Magnetica Nucleare. Da questa analisi risulta che la posizione del legame interglicosidico per tale monoso è la 4.

### 3.9. Determinazione della configurazione assoluta

L'acido glucuronico e l'acido galattoamminouronico sono stati determinati come ottilglicosidi acetilati, previa riduzione del gruppo carbossilico.

La reazione è stata condotta su 2 mg di *O*-chain, quest'ultimi sono stati sottoposti alla reazione di metanolisi onde ottenerne i metil glicosidi.

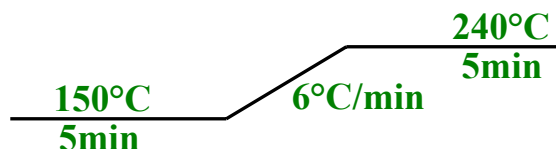
Si procede quindi con la riduzione del gruppo carbossilico: il campione viene anidrificato sotto vuoto con  $P_2O_5$  e successivamente ridotto con 300  $\mu$ l di litiotrietilborodeuteruro ( $LiB(CH_2CH_3)_3D$ ), la miscela è quindi tenuta in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente, con tale reazione si riducono i gruppi carbossilici degli acidi uronici a gruppi alcolici. L'eccesso di reattivo viene distrutto per aggiunta di qualche goccia di AcOH glaciale e poi il campione è portato a secco aggiungendo più volte metanolo.

Si esegue quindi la reazione di N-acetilazione: il campione viene prima anidrificato e poi vi si aggiunge 500  $\mu$ l di metanolo anidro e 50  $\mu$ l di anidride acetica, la miscela è tenuta 20 ore in agitazione a temperatura ambiente.

Si procede ora con la derivatizzazione dei monosi per poterli analizzare mediante GC-MS come ottilglicosidi acetilati.

Il campione è anidrificato e poi trattato con 1 goccia di TFA concentrato e 500  $\mu$ l di (+) 2-ottanolo, si incuba a 130°C per 20 ore. Successivamente si elimina il TFA portando più volte a secco il campione con isopropanolo, infine si acetila e si inietta al GC-MS.

L'analisi è stata effettuata usando la seguente rampa a gradiente di temperatura:



Dal confronto con i tempi di ritenzione degli standard si è determinata per questi due monosi una configurazione di tipo D.

Per quanto riguarda invece la configurazione assoluta della chinovosammina questa è stata determinata dal valore del potere rotatorio del suo  $\alpha$ -metil glicoside.

Per effettuare questa analisi un' aliquota della della *O*-chain (5 mg) è stata trattata con 1 M HCl/MeOH (1 ml) per ottenerne i metil glicosidi, successivamente è stata neutralizzata e N-acetilata con 50  $\mu$ l di anidride acetica per 2 ore a 20 °C.

Dopo evaporazione la miscela è stata purificata mediante HPLC, usando una colonna C18 Nautilus e come eluente acqua milli-Q.

In questo modo è stato possibile isolare il metil 2-acetamido-2,6-dideossi- $\alpha$ -glucopiranoside e misurarne il potere rotatorio specifico :  $[\alpha]_D = -102$  (c 0.1, H<sub>2</sub>O) [40].

Da questo risultato si evince che la configurazione assoluta per la QuipNAc è la L.

### 3.10. Isolamento del 4-O-(carbossietil)-glucuronico

Per quanto concerne la configurazione assoluta dell' 4-O-(1-carbossietil)-glucuronico essa presenta il problema di una duplice determinazione, in quanto, oltre a stabilire la configurazione D o L del monosaccaride, è necessario determinare la configurazione del centro chirale dell' acido lattico. Si è reso quindi necessario il suo isolamento.

Per isolare tale monoso un' aliquota della *O*-chain (5 mg) è stata trattata con 2 M HCl/MeOH (1 ml) per ottenerne i metil glicosidi, quindi è stata neutralizzata e N-acetilata con 50  $\mu$ l of anidride acetica per 12 ore a 25 °C.

Si procede poi con la riduzione del gruppo carbossilico: il campione viene anidrificato sotto vuoto con  $P_2O_5$  e successivamente ridotto con 300  $\mu$ l di superidruror, la miscela è quindi tenuta in agitazione tutta la notte a temperatura ambiente. L'eccesso di reattivo viene distrutto per aggiunta di qualche goccia di AcOH glaciale e poi il campione è portato a secco aggiungendo più volte metanolo.

Con tali reazioni si sono così ottenuti i metilglicosidi ridotti che sono quindi separati mediante cromatografia HPLC su una colonna C18 Nautilus semipreparativa, usando come eluente una miscela di acqua milli-Q e metanolo in rapporto di 9:1; il profilo cromatografico è mostrato in figura 20:

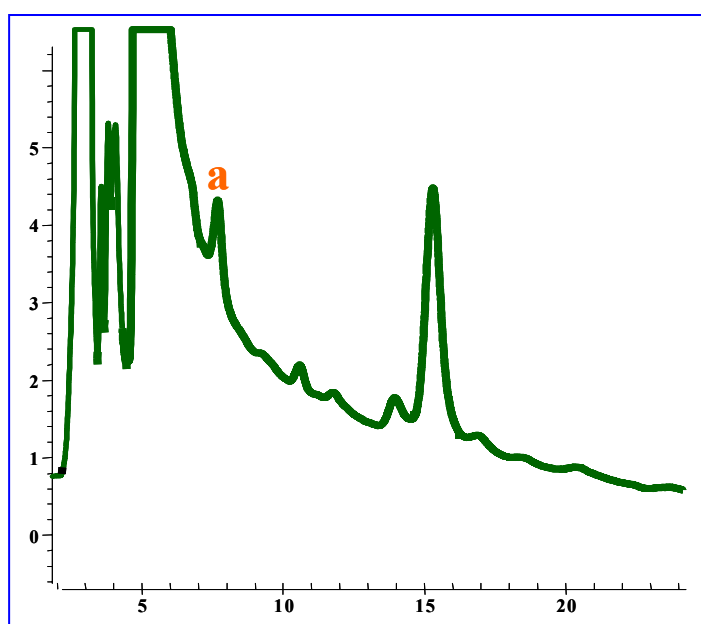
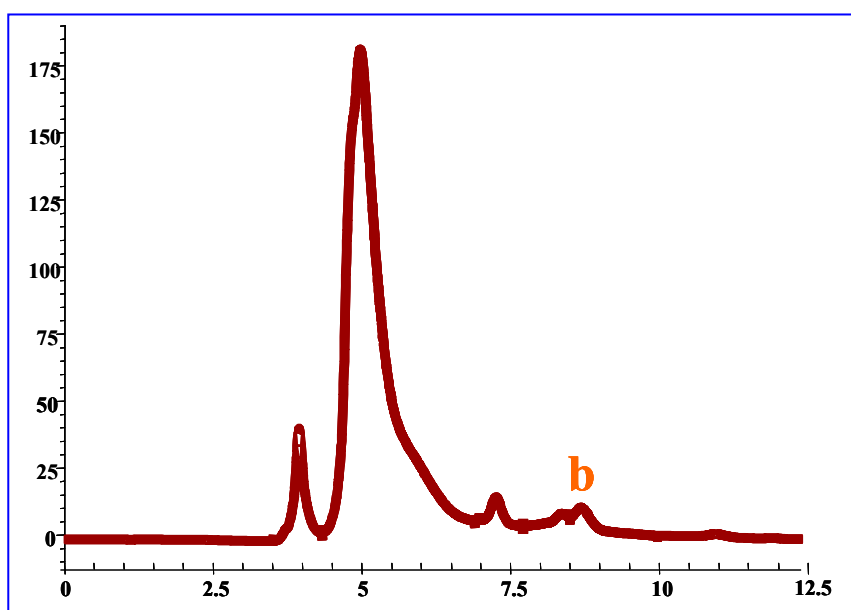


Figura 20: Profilo cromatografico C18 semipreparativa.

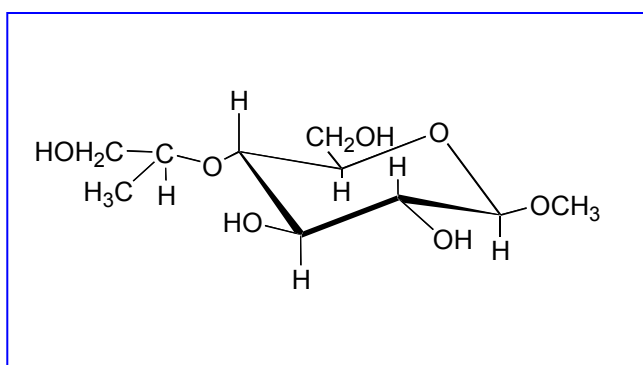


Un'aliquota di tutte le frazioni raccolte è stata acetilata ed analizzata mediante GC-MS. Da tale analisi risulta che la frazione **a** è quella contenente il monoso in questione. Purtroppo essa non è risultata priva di impurezze, per cui è stato necessario sottoporla ad una ulteriore cromatografia HPLC, usando una colonna C18 Nautilus analitica ed eluendo con acqua milli-Q; il profilo cromatografico è mostrato in figura 21:



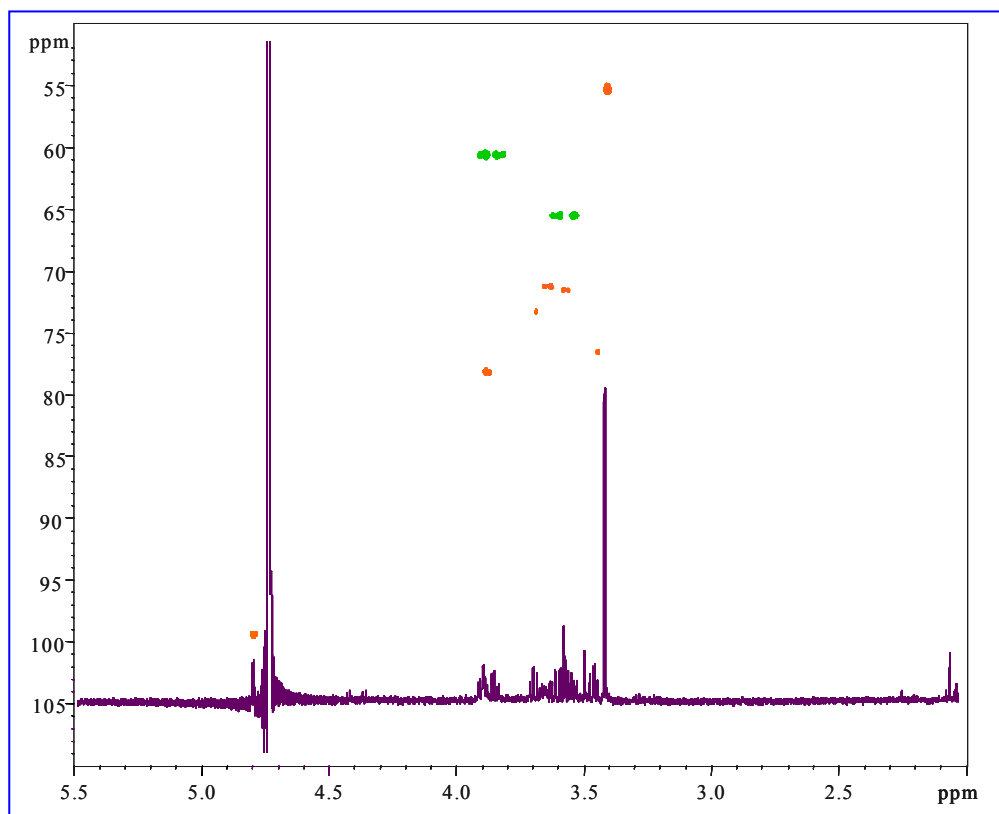
**Figura 21:** *Profilo cromatografico C18 analitica.*

Anche in questo caso un'aliquota di tutte le frazioni raccolte è stata acetilata ed analizzata mediante GC-MS: la frazione **b** è quella contenente il  $\beta$ -4-*O*-[2-(1-idrossi)propil]-D-Glcp-OMe (fig 22):



**Figura 22:** *Metil 4-*O*-[(1-idrossi)propil]-β-D-Glucopiranoside.*

Tale monosaccaride è stato caratterizzato completamente mediante spettroscopia NMR (Tabella 5), effettuando gli esperimenti al 600MHz. In figura 23 è mostrato un esperimento HSQC-DEPT.



**Figura 23:** HSQC-DEPT al 600MHz del Metil 4-O-[2-(1-idrossi)propil]-β-D-Glucopiranoside

**Tabella 5:** Chemical shifts  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -NMR.

Metil 4-O-[2-(1-idrossi)propil]-β-D-Glcp	H1	4.80	C1	100.7
	H2	3.57	C2	72.8
	H3	3.69	C3	74.6
	H4	3.45	C4	77.8
	H5	3.65	C5	72.5
	H6	3.84/3.88	C6	61.9
CH <sub>3</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH	H1/1'	3.53/3.62	C1	66.8
	H2	3.89	C1	79.4
	H3	1.19	C3	17.7

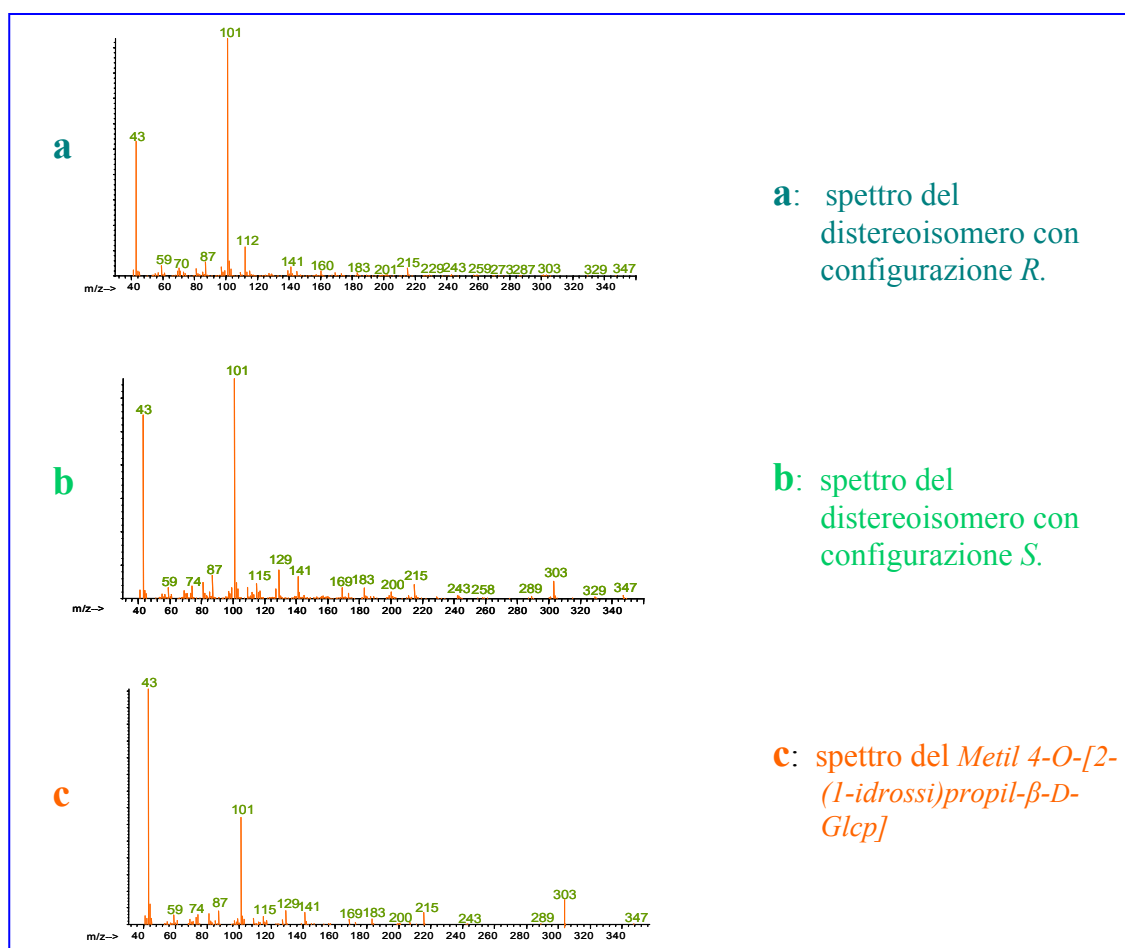
Purtroppo l'esigua quantità di prodotto ottenuto (500 µg) non ne ha permesso la misura del suo potere rotatorio specifico.

A questo punto è stato necessario sintetizzare i due monosaccaridi aventi configurazione opposta al centro chirale del sostituito.

Punto di partenza è stato il D-glucosio, sulla base del fatto che i dati di chemical shifts NMR del  $^{13}\text{C}$  concordavano con una configurazione D per l'acido glucuronico sostituito. Questa configurazione è stata dedotta utilizzando un approccio riportato in letteratura [41,42] che consente di stabilire, sulla base dei dati  $^{13}\text{C}$  NMR, la configurazione assoluta di un residuo zuccherino quando è nota quella dello zucchero che lo precede. Sono state quindi prese in esame le differenze di chemical shifts dei carboni riscontrate per i due disaccaridi diastereoisomerici L-QuiNAc-(1→2)-D-4-O-(1-carboxyethyl)-Glc<sub>p</sub>A e L-QuiNAc-(1→2)-L-4-O-(1-carboxyethyl)-Glc<sub>p</sub>A [41,42]. Particolarmente diagnostico è stato il valore -0.92 ppm, ottenuto dalla differenza tra il C-3 del 4-O-(1-carbossietil)-Glc<sub>p</sub>A nella O-chain di *Hp* e lo stesso carbonio del composto di riferimento [43], entrambi riportati in Tabella 6. Considerato che i dati riportati in letteratura per i diastereoisomeri LD e LL sono rispettivamente di -1.6 e 0 ppm, si è ritenuto che il 4-O-(1-carbossietil) Glc<sub>p</sub>A abbia una configurazione di tipo D.

Il D-glucosio è stato quindi prima trasformato nel metil 2,3,6-tri-*O*-benzil glucopiranoside, il quale è stato poi trattato separatamente sia con l'acido 2-(*S*)-cloropropionico che con il 2-(*R*)-bromopropionico in presenza di NaH. I prodotti ottenuti sono stati deprotetti e derivatizzati come metil glicosidi acetilati.

Quindi la configurazione assoluta del sostituito è stata determinata mediante GC-MS, per confronto con gli spettri di massa dei due diversi diastereoisomeri sintetizzati (fig 24).



**Figura 24:** Confronto tra gli spetttri di massa del monoso e dei diastereoisomeri.

Come si può notare dal confronto tra gli spetttri di massa dei 2 diastereoisomeri sintetizzati e del monosaccaride isolato, risulta che la configurazione del sostituento è la *S*.

### 3.11. Spettrometria di massa MALDI

Gli spettri MALDI-TOF sono stati effettuati su uno strumento Applied Biosystems 4700 Proteomics con analizzatore TOF/TOF Optics. Come matrice è stato usato il 2,5 di-idrossibenzoico (DHB) ad una concentrazione pari a 25 mg/mL in 20% acetonitrile in acqua. Gli spettri sono stati acquisiti in modalità negativa.

Lo spettro è quello riportato in figura 25 e mostra segnali solo per quattro unità ripetitive.

In tale spettro, infatti, la differenza di massa tra i segnali a  $m/z$  845.23, 1673.23, 2501.14, 3329.0 e  $m/z$  4156.81 è sempre di 828 a.m.u. e suggerisce un'unità ripetitiva formata da quattro zuccheri.

Tale differenza corrisponde alla somma dei seguenti monosi: GlcA (176 a.m.u.), GalNAcA (217 a.m.u.), QuiNAc (187 a.m.u.) e 4-O-(1-carbossietil)-GlcP A (248 a.m.u.).

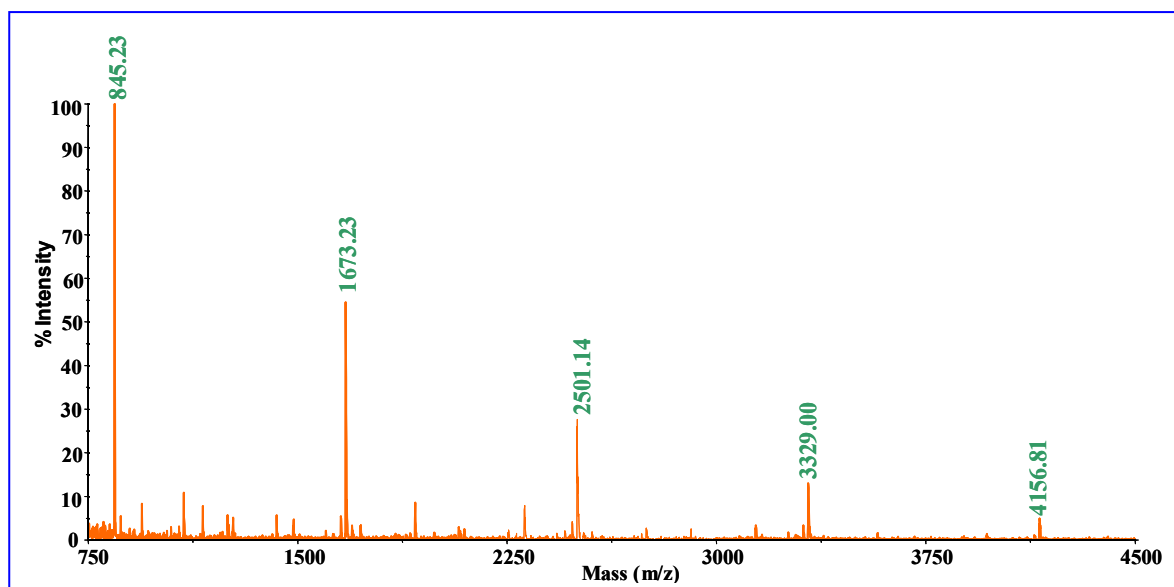


Figura 25: Spettro MALDI-TOF eseguito in modalità negativa della O-chain di *Halomonas p.*

### 3.12. Spettroscopia NMR della *O*-chain

L'assegnazione completa di tutti i segnali dei protoni e dei carboni dell'unità ripetitiva della *O*-Chain è stata determinata attraverso lo studio di spettri NMR 2D- (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC e NOESY) e 1D- (HOHAHA e ROE) (Tabella 6). Nello spettro protonico (Fig. 27a) la regione a campi bassi mostra sei segnali, di cui solo quattro presentano una correlazione con i relativi carboni anomerici. In particolare i segnali dei protoni anomerici a  $\delta$  5.14, 4.71, 4.66, e 4.53 assegnati, rispettivamente, ai residui **A-D**, vengono identificati dalla loro correlazione con i segnali dei carboni a  $\delta$  98.0, 100.8, 102.2 e 103.2. (Fig. 27b).

Le configurazioni anomeriche sono state determinate sulla base dei valori della costante di accoppiamento  $^3J_{H1,H2}$  e/o dal chemical shifts dei protoni anomerici.

Partendo dai segnali di questi protoni, l'identificazione di ogni residuo è stata ottenuta mediante gli esperimenti COSY e TOCSY.

Il segnale a  $\delta$  5.14 (d, 3.1 Hz, H1) del residuo **A** è correlato al segnale a  $\delta$  4.15 (dd, 3.1 e 12.0 Hz, H2), che, a sua volta, è correlato al segnale del carbonio a  $\delta$  50.1. E' stato, perciò, dedotto che il residuo **A** è un 2-amino-2-deossi; il segnale H2 è correlato al segnale a  $\delta$  4.01 (bd, 12.0 Hz, H3), e questo, a sua volta, è correlato al singoletto slargato a  $\delta$  4.58 (H4) e quest'ultimo al segnale a  $\delta$  5.07 (H5), che appare ancora come un singoletto. Prendendo in considerazione sia i valori di chemical shifts che quelli delle costanti di accoppiamento, il residuo **A** è stato, quindi, riconosciuto come un'unità di  $\alpha$ -GalpNAcA.

Il residuo **C** è stato identificato come  $\beta$ -QuipNAc, tale identificazione è stata ottenuta partendo sia dal segnale anomerico ( $\delta$  4.66, d, 8 Hz) che da quello del 6-metile a  $\delta$  1.29 (d, 5.8 Hz). La configurazione *gluco* è stata dedotta dal largo valore (8Hz) della costante di accoppiamento  $^3J_{H,H}$  per il protone H2 ( $\delta$  3.87) e quello H4 ( $\delta$  3.21).

I segnali anomerici del residuo **B** ( $\delta$  4.71, d, 6.9 Hz) e di quello **D** ( $\delta$  4.53, d, 6.8 Hz) sono stati assegnati a due residui di  $\beta$ -GlcA sulla base della molteplicità del protone, ricavata mediante esperimenti HOHAHA. In particolare, il fatto che i loro protoni H5 appaiano come doppietti (10.0 Hz) suggerisce la presenza di un gruppo

carbossilico al C6. Tutto ciò è confermato anche dall' etero-correlazione del H5 con i segnali carbossilici nello spettro HMBC.

La presenza di 1-carbossietile è evidenziata dal doppietto, attribuibile ad un metile, a  $\delta$  1.45 (7.0 Hz), dal quartetto a  $\delta$  4.36 (7.0 Hz) nello spettro  $^1\text{H}$  NMR e dalla loro correlazione al segnale carbossilico a 178.3 ppm nello spettro HMBC. L'attribuzione del 1-carbossietile come sostituito è stata dedotta dall'accoppiamento dipolare e dall'accoppiamento etero-nucleare scalare che il protone metinico mostra con i protoni H3 e H4 e il C4 del residuo B.

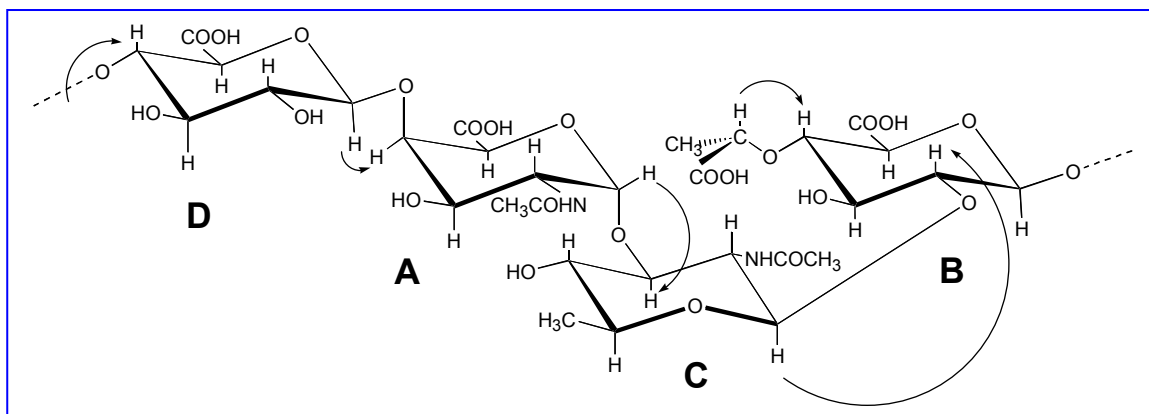
Nella regione a campi alti dello spettro protonico, i due singoletti a 2.03 e a 1.98 ppm, che correlano con i segnali dei carboni a 23.6 e a 23.5 ppm, così come si nota nell'esperimento HSQC e a 175.0 e a 174.5 ppm in quello HMBC, sono assegnati, rispettivamente, al gruppo acetamidico della QuiNAc e del GalNAcA.

La sequenza dei quattro residui e i punti di attacco dei legami glicosidici dell'unità ripetitiva (figura 26) è stata dedotta mediante l' esperimento HMBC, dal quale si riconoscono le seguenti correlazioni: H1/C1 del residuo **D** con C4/H4 di quello **A**; il carbonio C1 del residuo **A** con il protone H3 di quello **C**; il protone H1 del residuo **C** con il carbonio C2 di quello **B**; H1/C1 del residuo **B** con C4/H4 di quello **D**.

Nello spettro  $^{13}\text{C}$ , i chemical shifts dei carboni glicosilati, che risuonano a campi bassi, confermano l'identificazione delle posizioni implicate nei legami glicosidici.

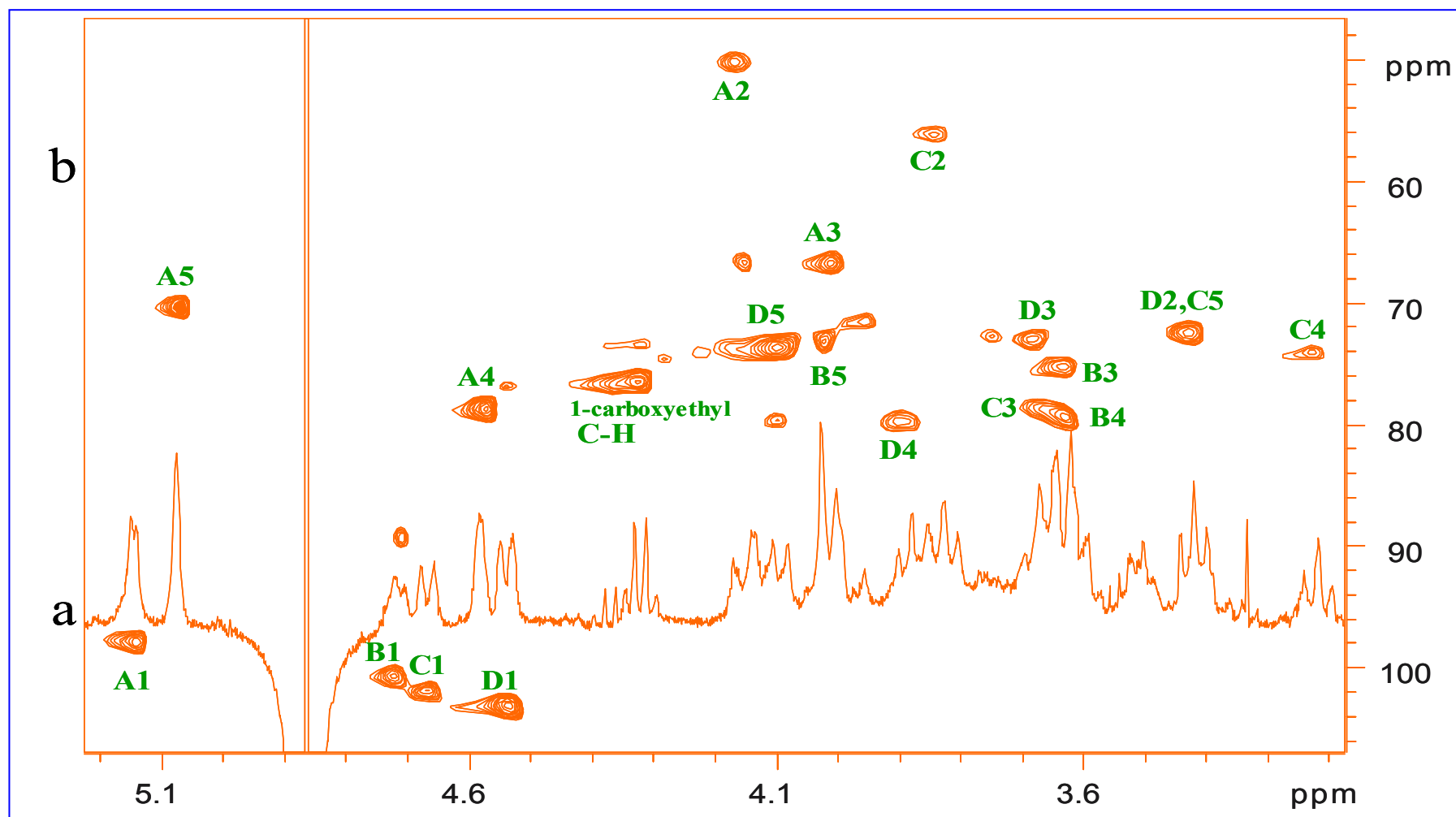
I contatti NOE inter-residuo (Fig. 28 e 26) si osservano tra il protone H1 del residuo **D** e il protone H4 di quello **A**, il protone H1 del residuo **A** e il protone H3 di quello **C**, il protone H1 del residuo **C** e il protone H2 di quello **B**, il protone H1 del residuo **B** e il protone H4 di quello **D**, confermando la sequenza monosaccaridica mostrata in figura 26.

I contatti NOE intra-residuo del protone H1 con i protoni H3 e H5 confermano la configurazione  $\beta$  per i residui **C**, **B** e **D**, invece quelli tra il protone H1 e H2 del residuo **A** confermano la configurazione  $\alpha$  per quest'ultimo residuo.



**Figura 26:** *Struttura della O-chain di Hp con i relativi contatti NOE.*





**Figura 27:** spettro HSQC al 400 MHz della O-chain di *Halomonas pantelleriensis*.

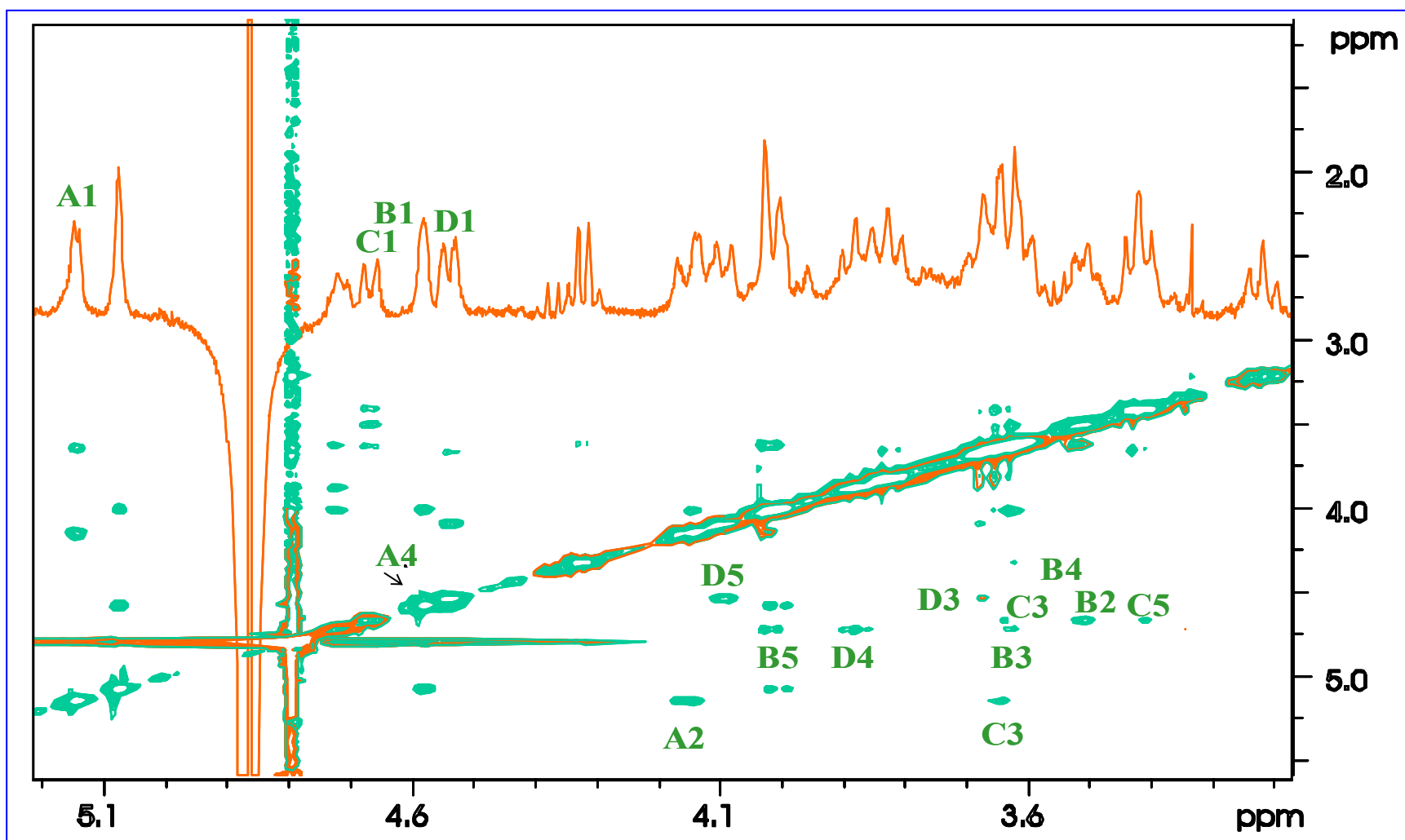


Figura 28: spettro ROESY al 400 MHz della O-chain di *Halomonas pantelleriensis*.

**Tabella 6:** *Chemical shifts  $^1H$  e  $^{13}C$ -NMR*

Sugar residue	Atom		Atom		Reference <sup>c</sup>
4- $\alpha$ -D-GalpNAcA <sup>a</sup> <b>A</b>	<b>H1</b>	5.14	<b>C1</b>	98.0	
	<b>H2</b>	4.15	<b>C2</b>	50.1	
	<b>H3</b>	4.01	<b>C3</b>	66.9	
	<b>H4</b>	4.58	<b>C4</b>	78.8	
	<b>H5</b>	5.07	<b>C5</b>	70.4	
			<b>C6</b>	172.8	
3- $\beta$ -L-QuipNAc <sup>b</sup> <b>C</b>	<b>H1</b>	4.66	<b>C1</b>	102.2	
	<b>H2</b>	3.87	<b>C2</b>	56.3	
	<b>H3</b>	3.64	<b>C3</b>	78.5	
	<b>H4</b>	3.21	<b>C4</b>	74.1	
	<b>H5</b>	3.42	<b>C5</b>	72.6	
	<b>H6</b>	1.29	<b>C6</b>	17.8	
4- $\beta$ -D-GlcpA <b>D</b>	<b>H1</b>	4.53	<b>C1</b>	103.2	
	<b>H2</b>	3.42	<b>C2</b>	72.6	
	<b>H3</b>	3.67	<b>C3</b>	73.1	
	<b>H4</b>	3.82	<b>C4</b>	79.8	
	<b>H5</b>	4.09	<b>C5</b>	73.8	
			<b>C6</b>	170.6	
2- $\beta$ -[4-O-(( <i>S</i> )-1-carboxyethyl)]-D-GlcpA <b>B</b>	<b>H1</b>	4.71	<b>C1</b>	100.8	103.6
	<b>H2</b>	3.51	<b>C2</b>	80.2	74.0
	<b>H3</b>	3.62	<b>C3</b>	75.3	76.2
	<b>H4</b>	3.61	<b>C4</b>	79.7	81.4
	<b>H5</b>	4.02	<b>C5</b>	73.2	75.1
			<b>C6</b>	173.0	175.0
CH <sub>3</sub> CHOHCOOH			<b>C1</b>	178.3	174.6
	<b>H2</b>	4.36	<b>C2</b>	78.5	77.8
	<b>H3</b>	1.45	<b>C3</b>	19.4	19.1

## ***Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125**

### **3.13. Condizioni di crescita del batterio**

Il batterio mutante di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125, isolato dalle acque marine dell'oceano Antartico [44], è stato cresciuto in condizioni aerobiche a 15°C. Il terreno di coltura utilizzato per la crescita del batterio è il TYP (costituito da 16 g L<sup>-1</sup> Bactotripton (Difco), 16 g L<sup>-1</sup> estratto di lievito (Difco), 16 g L<sup>-1</sup> sali marini, pH 7.5). Quando la coltura liquida ha raggiunto la tarda fase esponenziale (12 O.D.<sub>600nm</sub>), le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 2700 rpm a 4°C per 15 min, ed infine sono state liofilizzate.

### **3.14. Procedura di estrazione del LOS**

Le cellule liofilizzate (4.49 g) sono trattate con 150 ml di miscela PCP, preparata secondo la procedura già descritta nel capitolo 2.

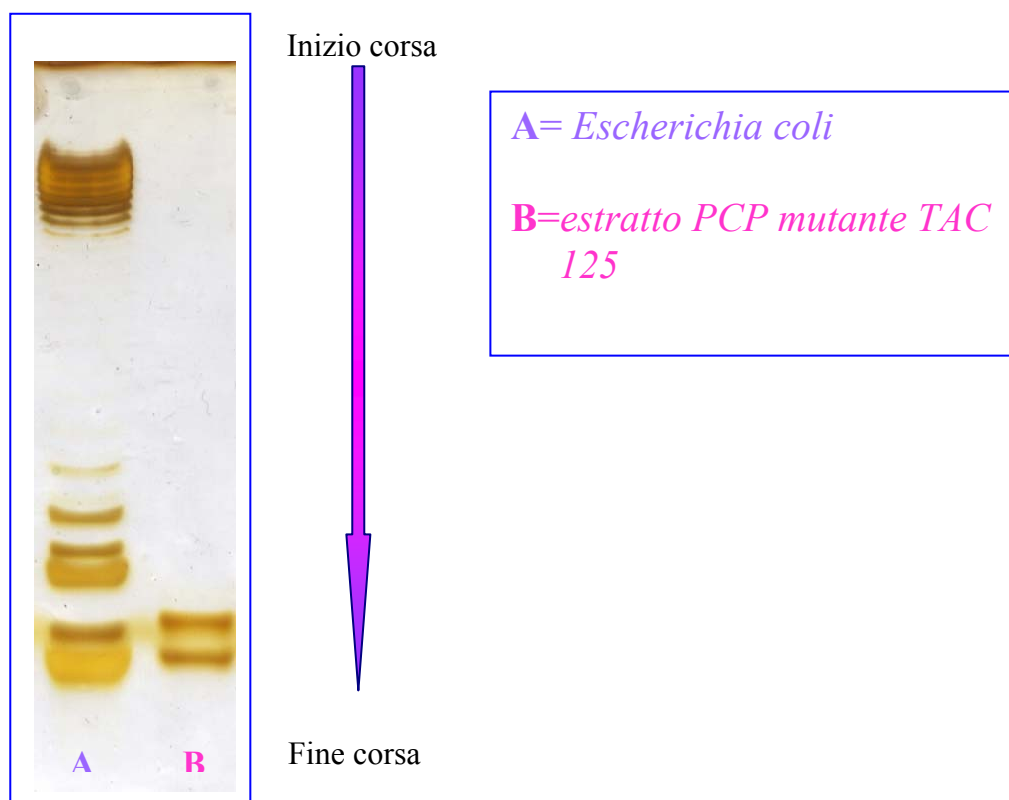
Le cellule sono sospese in tale soluzione ed omogeneizzate con Ultraturrax per 15 minuti. La sospensione è poi lasciata sotto agitazione per 1h a temperatura ambiente e centrifugata a 7000 rpm a 10 °C per 15 minuti. Il surnatante è stato recuperato e sul precipitato è stata ripetuta l'estrazione per altre due volte. I surnatanti sono stati riuniti, e, dopo allontanamento del cloroformio e dell'etere, è stata effettuata la precipitazione del LOS mediante piccole aggiunte di acqua. Dopo centrifugazione a 7000 rpm a 26 °C per 15 min il fenolo è stato allontanato ed il precipitato è stato lavato con fenolo acquoso all'80% per due volte ed un'ultima volta con acetone.

Dopo ridissoluzione in acqua e liofilizzazione, sono stati ottenuti 185 mg della frazione lipooligosaccaridica.

La percentuale in peso di LPS da cellule batteriche normalmente è compresa tra l'1 ed il 3 %, in questo caso il LOS rappresenta il 4.1% del peso totale delle cellule secche.

### 3.15. Elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiodeossicolato (DOC-PAGE)

L'elettroforesi è stata condotta esattamente nelle stesse condizioni operative di *Halomonas pantelleriensis*.



#### analisi della corsa elettroforetica

La presente analisi conferma l'ipotesi della natura "rough" del batterio.

Osservando la migrazione del materiale lipopolisaccaridico si nota, infatti, che questa forma due bande piuttosto slargate al fronte del gel. Una così notevole mobilità è indice di un basso peso molecolare del prodotto esaminato, ossia di una frazione oligosaccaridica corta rispetto alla parte lipidica. Inoltre l'assenza del particolare pattern a gradini è indice della mancata presenza del LPS.

### 3.16. Analisi degli zuccheri e dei lipidi

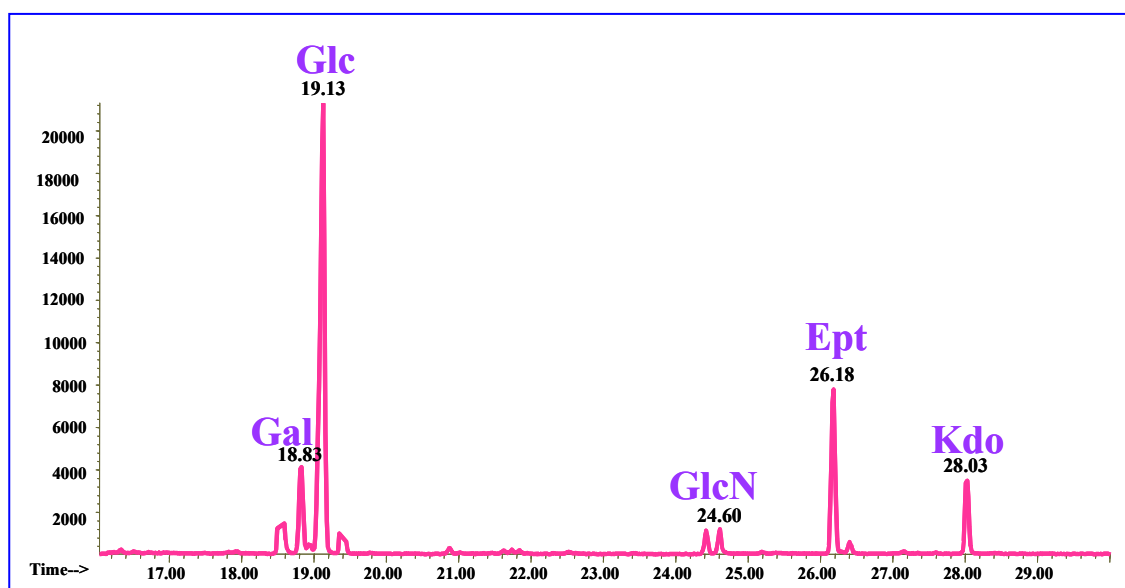
Le seguenti analisi vengono condotte come per *Halomonas pantelleriensis* e si sono ottenuti i seguenti risultati:

**Tabella 7:** *Acidi grassi del Lipide A del mutante di P. haloplanktis TAC 125.*

Acidi grassi	C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>14:0</sub>
Posizioni ossidrilate			3-OH

**Legenda:** C<sub>12:0</sub>=acido laurico; C<sub>14:0</sub>=acido miristico; C<sub>14:0</sub>3-OH=acido idrossimiristico.

Dall'analisi dei tempi di ritenzione dei picchi cromatografici, confrontati con quelli standard, e dalla valutazione della frammentazione degli spettri di massa sono stati identificati i monosi costituenti la catena oligosaccaridica (fig. 29).



**Figura 29:** *Composizione monosaccaridica del mutante di Pseudoalteromonas h. TAC125.*

Quest'analisi ha mostrato la presenza di monosaccaridi caratteristici della struttura di un lipooligosaccaride. Infatti, accanto alla glucosammina, che è contenuta nel lipide A, si ritrovano gli zuccheri tipici dell'oligosaccaride "core" e cioè il Kdo, gli eptosi e gli esosi.

L'analisi dei lipidi e dei monosaccaridi suggerisce fortemente che il LOS prodotto dal mutante di *P.haloplanktis* è totalmente diverso dal wild-type, come mostrato in tabella 8.

**Tabella 8:** *Monosi costituenti la catena oligosaccaridica.*

<i>P. haloplanktis</i> TAC 125	Mutante
N-acetil-glucosammina	N-acetil-glucosammina
Kdo	Kdo
eptoso	eptoso
N-acetil-mannosammina	glucosio
galattosio	galattosio

### 3.17. Ottenimento della componente oligosaccaridica

Allo scopo di ottenere la frazione oligosaccaridica libera da acidi il materiale estratto con il PCP è trattato nel modo seguente:

180 mg di campione sono tenuti in essiccatore, sotto vuoto, per una notte, e sono poi disciolti in 9 ml di idrazina anidra. La soluzione così ottenuta è tenuta in agitazione a 37°C per 1.5 h [45]. Quindi la miscela viene raffreddata in un bagno a ghiaccio ed è stato aggiunto acetone freddo, in piccole porzioni, fin quando non si è osservato una precipitazione completa. Si è proceduto, quindi, con una centrifugazione a 4°C per 30 minuti a 7000 rpm.

Il precipitato è lavato due volte con acetone freddo ed infine sciolto in acqua e liofilizzato, ottenendo 133 mg di prodotto.

Esso è stato poi trattato con 5 ml di KOH 4 M, sotto flusso di Argon, e la soluzione è stata incubata per 16 h a 120 °C. Trascorso questo tempo, essa è stata neutralizzata, fino a pH 6, con HCl 2 M e si è eseguita un'estrazione con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

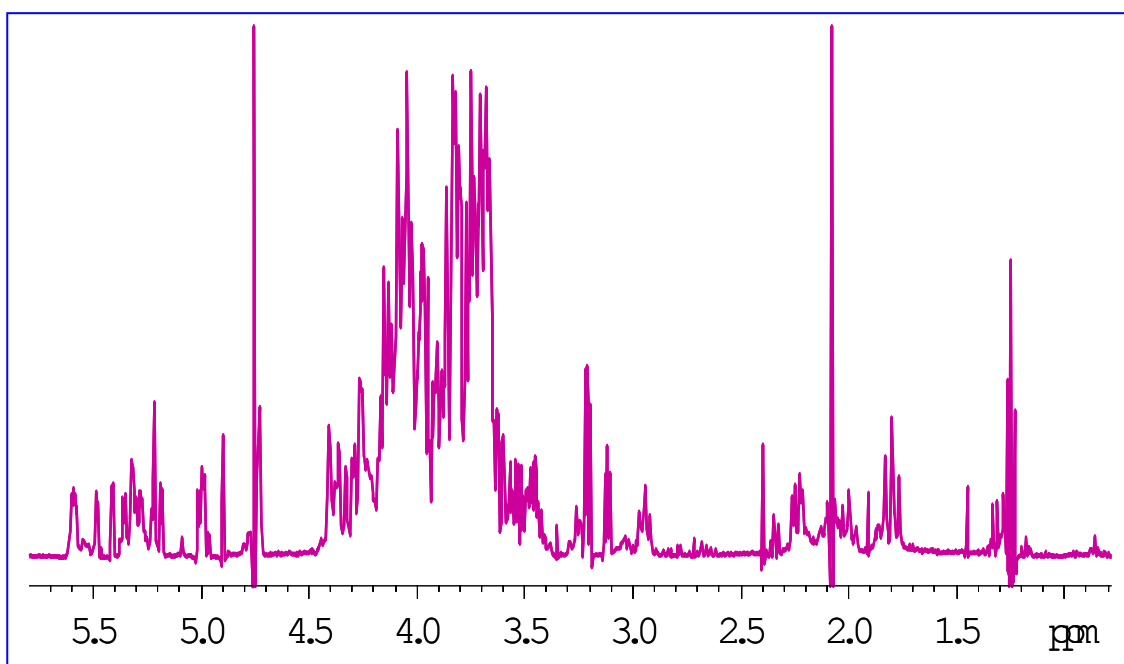
Gli oligosaccaridi contenuti nella fase acquosa sono stati poi purificati dai sali tramite una cromatografia gel filtration nelle seguenti condizioni:

- ✚ **fase stazionaria**    Sephadex G-10 (Pharmacia)
- ✚ **parametri della colonna**      d = 1.5 cm  
   h = 45 cm  
   flusso = 12 ml/h  
   eluente = NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>

Dopo liofilizzazione si sono ottenuti 15 mg di campione, contenente una miscela di oligosaccaridi, chiamata frazione OS.

Sulla frazione OS fosforilata sono stati effettuati sia esperimenti di spettrometria di massa che di spettroscopia NMR (figura 30), per poter raccogliere il maggior numero di informazioni strutturali, prima di procedere ad un'ulteriore purificazione.



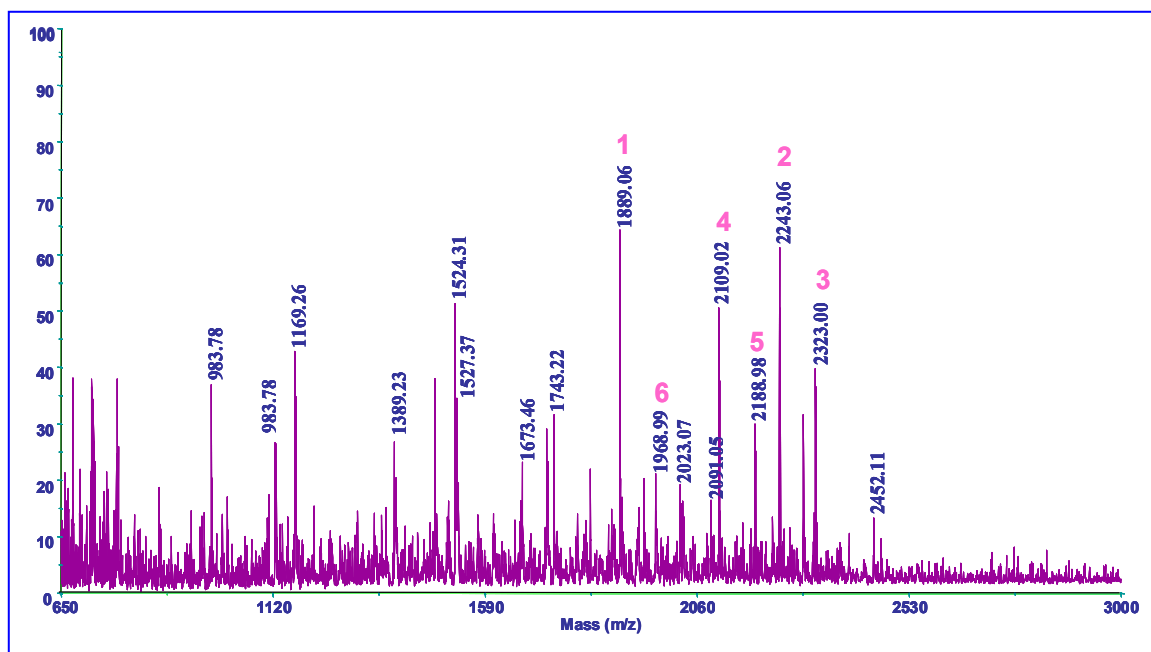


**Figura 30:** Spettro  $^1\text{H}$  NMR della frazione OS fosforilata in  $\text{D}_2\text{O}$  a 400 MHz.

Nello spettro protonico si osservano numerosi segnali nella zona anomERICA tra 4.5 e 5.5 ppm, che non essendo apparentemente in rapporto stechiometrico tra loro, suggeriscono la presenza di una miscela di prodotti. Inoltre, i numerosi segnali intorno a 2  $\delta$  sono indicativi della presenza di più unità di Kdo, essendo essi attribuibili ai protoni 3- $\text{CH}_2$  di tali unità. Il segnale a  $\delta$  3.26 ppm indica anche la presenza di fosfoetanolamina, confermata anche dal segnale a  $\delta$  41.4 nello spettro  $^{13}\text{C}$ .

Sono stati fatti a questo punto diversi tentativi di purificazione degli oligosaccaridi al HPLC con colonna a scambio anionico, utilizzando un detector amperometrico, ma purtroppo né con questo sistema né con cromatografie a gel filtration è stato possibile risolvere nei singoli componenti la miscela.

Anche lo spettro MALDI, riportato in figura 31, evidenzia per il mutante di *P. haloplanktis* TAC 125 un core costituito da una complessa miscela di oligosaccaridi fosforilati. La differenza tra le specie è stata attribuita alla differente lunghezza degli oligosaccaridi e/o al numero di gruppi fosfato, ed i principali segnali sono stati identificati così come mostrato in Tabella 9.



**Figura 31:** Spettro MALDI eseguito in modalità negativa della frazione fosforilata.

**Tabella 9:** Interpretazione dello spettro MALDI.

Picco n°	Massa (Da)		Struttura corrispondente
	Identificato	Calcolato	
	(M-H) <sup>-</sup>	M <sub>w</sub>	
1	1889.06	1890.044	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> Hep <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
2	2243.05	2244.156	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> Hep <sub>3</sub> Hex <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
3	2322.99	2324.123	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> Hep <sub>3</sub> Hex <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>
4	2109.02	2110.104	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>3</sub> Hep <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
5	2188.98	2190.070	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>3</sub> Hep <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>
6	1968.99	1970.010	HexN <sub>2</sub> Kdo <sub>2</sub> Hep <sub>2</sub> Hex <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>

### 3.18. Analisi di metilazione

1 mg di campione anidro è stato N-acetilato per trattamento con 500  $\mu$ l di MeOH anidro e con 50  $\mu$ l di anidride acetica, allo scopo di acilare i gruppi amminici, per rendere più solubile il composto in DMSO. La reazione è lasciata andare un'intera notte sotto agitazione magnetica.

Il campione è stato portato a secco e tenuto una notte in essiccatore.

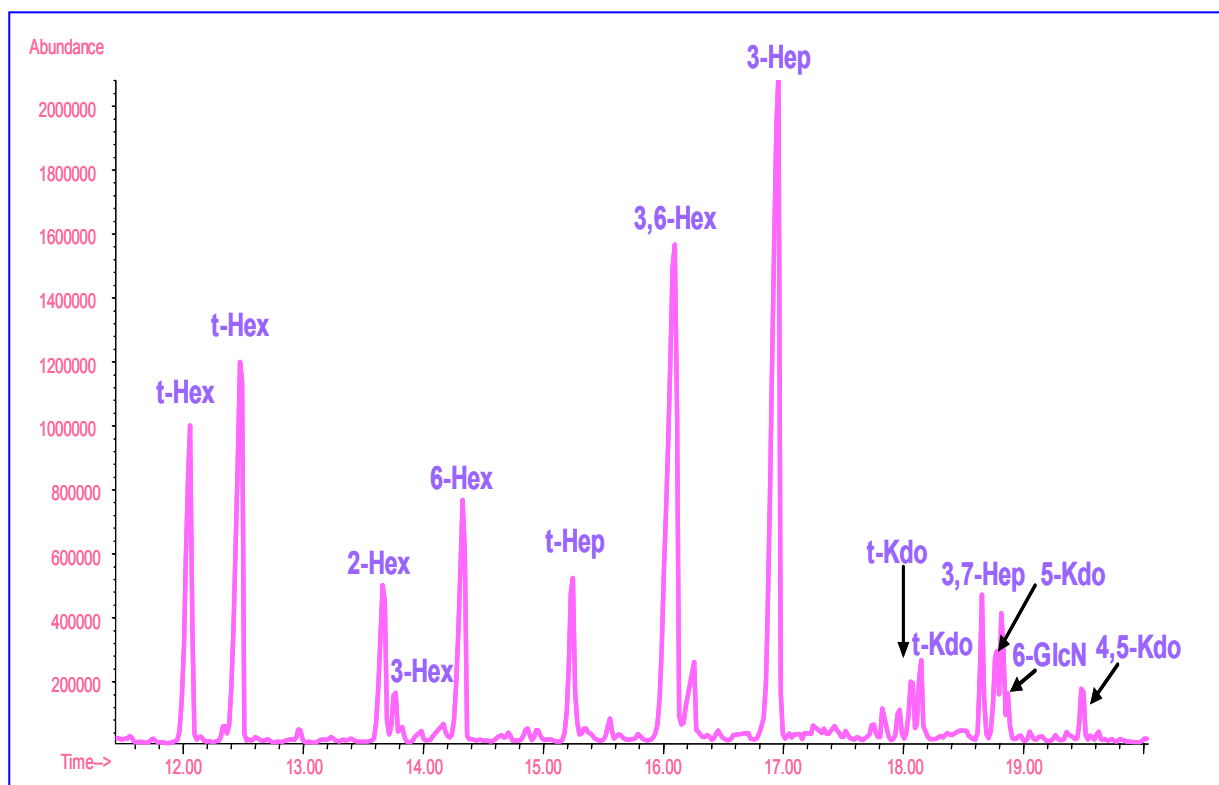
A questo punto sono stati aggiunti 300  $\mu$ l di DMSO anidro ed è stato insufflato argon. Solo dopo che è avvenuta la completa dissoluzione è stata aggiunta una punta di spatola di NaOH triturrata. La soluzione è stata così lasciata sotto agitazione magnetica per 1 h a temperatura ambiente. Trascorso tale tempo, alla soluzione preventivamente ghiacciata, sono stati aggiunti, a freddo, 300  $\mu$ l di ioduro di metile ( $\text{CH}_3\text{I}$ ). La miscela risultante è stata fatta reagire a temperatura ambiente sotto agitazione magnetica per 1 h. Dopo questo tempo è stata aggiunta acqua ultrapura (Romil) e quindi si è estratto con cloroformio, onde allontanare i sali.

Il campione permetilato anidro è stato ridotto al gruppo carbossimetilico con 300  $\mu$ l di litiotrietilborodeuterio ( $\text{LiB}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3\text{D}$ ), per una notte, sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Si è aggiunto poi  $\text{CH}_3\text{COOH}$  per distruggere l'eccesso di deuterio, ed il campione è stato deionizzato su una colonnina di resina Dowex 50W-X8 ( $\text{H}^+$ ). La resina è stata impaccata e lavata con EtOH al 50%. Il campione è stato quindi eluito con 3 ml dello stesso solvente, e portato a secco. Successivamente è stato idrolizzato in condizioni blande, con 300  $\mu$ l di TFA 0.1 M a  $100^\circ\text{C}$  per 30 min, per scindere il legame chetosidico, e ridotto con  $\text{NaBD}_4$  a temperatura ambiente per 16 h.

A questo punto è stato possibile idrolizzare l'oligosaccaride completamente con 250  $\mu$ l di TFA 2 M a  $121^\circ\text{C}$  per 2 h. I monosi metilati, così liberati, sono ridotti per trattamento con  $\text{NaBD}_4$  in EtOH per 1 h.

Infine gli alditoli metilati sono stati acetilati con 100  $\mu$ l di anidride acetica e 200  $\mu$ l di piridina a  $100^\circ\text{C}$  per 1.5 h.

Gli alditoli acetati parzialmente metilati, così ottenuti, sono stati analizzati alla GC-MS ed identificati interpretando gli spettri di massa ed i relativi tempi di ritenzione a carico di ciascun segnale cromatografico (fig 32).



**Figura 32:** Spettro degli AAPM del mutante di *P.haloplanktis* TAC 125.

L'analisi di permetilazione ha indicato la presenza di due esosi terminali, che dai tempi di ritenzione sono risultati essere il glucosio ed il galattosio. Inoltre si evince la presenza di unità di esosi 2-legati, 6-legati e 3,6-legati ed unità di eptosi terminali e 3-legati. Si nota anche la presenza di unità di Kdo terminale e 5-legato e la glucosammina 6-legata. La presenza di glucosamminitolo non è evidenziata da tale analisi forse a causa della sua più elevata volatilità.

### 3.19. Spettroscopia NMR

La completa assegnazione di tutti i segnali dei protoni e dei carboni è stata effettuata mediante esperimenti DQF-COSY, TOCSY, ROESY,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC, mentre i gruppi fosfato sono stati rivelati mediante un esperimento  $^{31}\text{P}$  NMR ed assegnati sulla base di esperimenti  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ -HSQC (tabella 10).

Nello spettro protonico il segnale a 5.07 ppm è stato attribuito al protone anomero dell'unità di una glucosammina riducente, tale protone risulta essere un multipletto a causa dell'accoppiamento con il  $^{31}\text{P}$ . I segnali a 5.47 e a 5.413 ppm, sulla base delle correlazioni dello spettro COSY e TOCSY, sono stati assegnati a due unità di glucosio, ambedue presenti in configurazione  $\alpha$ . La configurazione è stata dedotta sia sulla base delle costanti  $^3J_{\text{H1,H2}}$  che sulla base dei chemical shifts  $^{13}\text{C}$  ottenuti dallo spettro di correlazione eteronucleare (HSQC).

Più complessa è stata l'identificazione sia delle unità di glucosio ramificato che delle unità di eptoso. Tali segnali, infatti, non si presentano come segnali discreti, essendo dati dalla sovrapposizione di uno stesso segnale anomero appartenente a più catene di oligosaccaridi.

Sulla base delle costanti di accoppiamento  $^3J_{\text{H1,H2}}$ , degli spettri TOCSY e dei valori di chemical shift dei carboni ottenuti dallo spettro HSQC è stato possibile individuare unità sia di  $\alpha$ -Glc che di  $\alpha$ -Hep nel gruppo di segnali a circa 5.27 ppm e a circa 5.17 ppm.

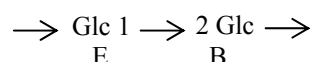
L'identificazione delle unità di galattosio è avvenuta combinando le informazioni ottenute dall'analisi dei monosi, dall'analisi dei prodotti di metilazione e dall'esame degli spettri COSY e TOCSY che suggerivano per questo monoso una posizione terminale. Alle unità di galattosio terminale sono stati attribuiti quindi i segnali anomerici a 5.00 ppm i quali, presentando una costante di accoppiamento di circa 4 Hz, devono essere anche essi in configurazione  $\alpha$ .

Il segnale a  $\delta$  4.89 ppm è stato attribuito ad unità di eptoso sulla base della piccola costante di accoppiamento  $^3J_{\text{H1,H2}}$ . Infine il doppietto con costante di accoppiamento di 8 Hz a 4.87 ppm è stato attribuito alle unità di glucosammina 6 legata del Lipide A.

L'analisi dei prodotti ottenuti dalla metilazione e un esperimento ROESY, riportato in figura 35 e Tabella 11, hanno permesso di riconoscere gran parte della sequenza di uno degli oligosaccaridi che costituisce la miscela in esame, secondo quanto segue.

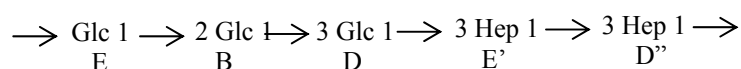
L'analisi di metilazione suggeriva la presenza di unità di glucosio 2 legato che sono state riconosciute come le unità **B**, in quanto il chemical shift del C2 risultava essere shiftato a campi bassi rispetto al metil glicoside di riferimento.

La presenza nello spettro ROESY di una correlazione tra H1 delle unità di glucosio **E** e H2 delle unità di glucosio **B** identificava la sequenza:

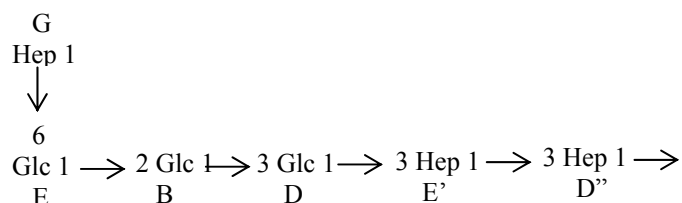


Inoltre nello spettro ROESY era presente una correlazione tra H1 dell'unità **B** e H3 dell'unità di glucosio **D**, che a questo punto è stata attribuita alle unità di glucosio 3,6 legato. Il protone anomero di queste unità presenta un NOE sia con il suo H2 che con un segnale a 4.05 ppm, che è stato identificato come H3 delle unità di eptoso **E'**.

Proseguendo, H1 dell'unità **E'** mostra un effetto NOE con H3 dell'unità **D''** completando così la sequenza:

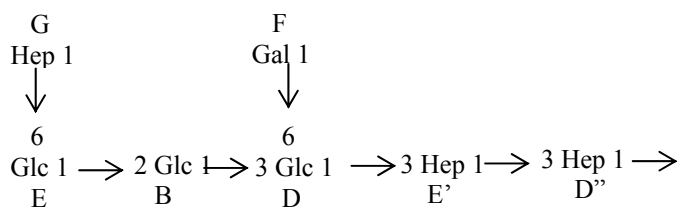


Sulla base dei dati di metilazione, che indicano la presenza di unità di eptoso terminale e glucosio 6 legato e sulla base di un effetto NOE tra H1 dell'unità **G** e H6 dell'unità **E** la sequenza dell'oligosaccaride risulta essere:

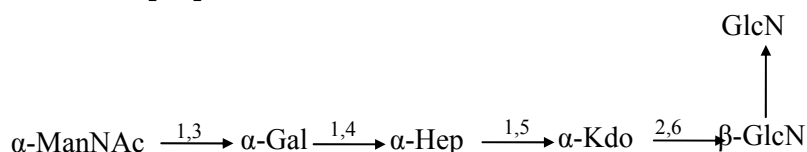


Infine il NOE tra H1 dell'unità **F** e H6a dell'unità **D** indicava il legame tra l'unità di galattosio terminale e il C6 del glucosio 3,6 legato.

Risulta, quindi, identificata una sequenza di questo tipo:



A questo punto della determinazione strutturale risulta evidente che non c'è alcuna similitudine tra questa parziale sequenza e quella qui di seguito riportata per *P.haloplanktis* TAC 125 [19]:



Dal confronto con i dati di letteratura è emerso che questa struttura oligosaccaridica del putativo mutante di *P. haloplanktis* TAC 125 risulta essere praticamente identica a quella riportata per *Escherichia coli* K12 [46] a meno della presenza di un'altra unità di eptoso terminale. È stato quindi necessario condurre delle indagini di biologia molecolare sul mutante allo scopo di verificare la natura del batterio stesso. Esperimenti di omologia di sequenza mediante alcune sonde genetiche hanno rivelato che in realtà si trattava di un ceppo di *E. coli*. Questo batterio è stato identificato come un mutante di *E. coli* K12 strain S17- $\lambda$ .pir, un microrganismo utilizzato per l'espressione di proteine provenienti dal batterio psicrofilo.

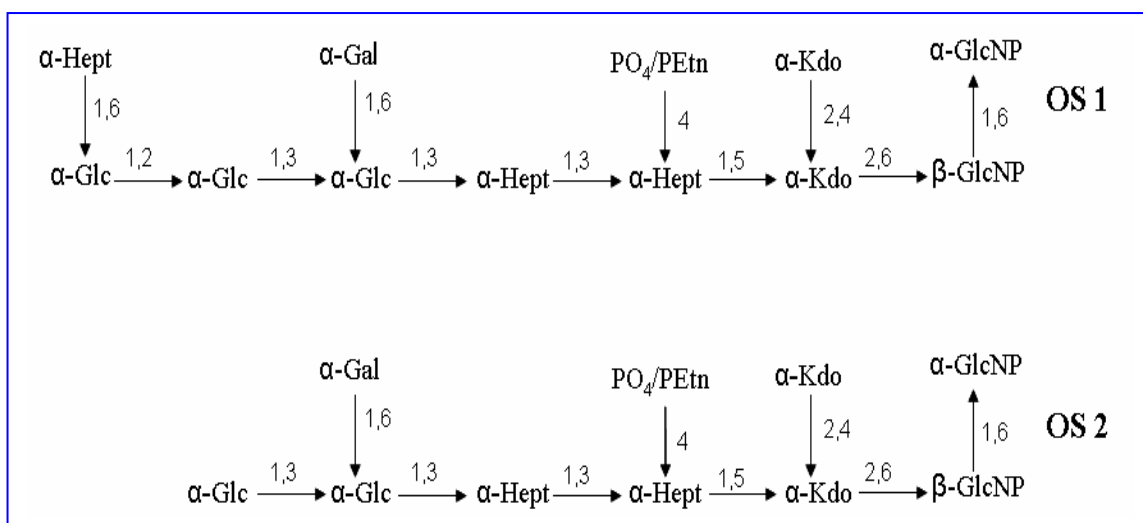
La struttura completa dell'oligosaccaride **1** è stata dedotta tenendo conto delle posizioni di legame del Kdo rivelate dalla mutilazione e dalla coincidenza di alcuni dati NMR di queste unità con quelle riportate per *Escherichia coli* K12 [46].

La posizione dei gruppi fosfato è stata dedotta dall'analisi dello spettro  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC. In questo esperimento il segnale di  $^{31}\text{P}$  a 2.46 ppm presenta una correlazione con il protone H4 dell'unità **D''**, suggerendo quindi che tale posizione è fosforilata.

La presenza di fosfoetanolamina (PEtn) è stata messa in evidenza dalla correlazione, rispettivamente, tra il segnale di  $^{31}\text{P}$  a 2.34 ppm e 3.26 ppm e nello spettro protonico a 3.26 e 4.05 ppm (Tabella 10). La posizione di questo sostituito è stata dedotta dalla correlazione tra lo stesso segnale di  $^{31}\text{P}$  ed un protone a 4.33 ppm, attribuibile alla posizione 4 dello stesso eptoso sulla base della similitudine con dati

riportati in letteratura. È stato, infatti, visto che la posizione 4 spesso risulta essere o fosforilata o sostituita con PEtn. Infine la posizione del fosfato sul carbonio anomero della GlcN I e sul C4 della GlcN II erano dedotte dalle rispettive correlazioni nello spettro  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  HSQC.

L'identificazione del secondo oligosaccaride, nella complessa miscela ottenuta da questo batterio, è stata dedotta sia sulla base degli esperimenti NMR che dai dati di metilazione nonché dai dati di spettrometria di massa MALDI, utilizzando la stessa procedura eseguita per l'OS 1.



**Figura 33:** Principali oligosaccaridi del mutante di *P.haloplanktis* TAC 125.

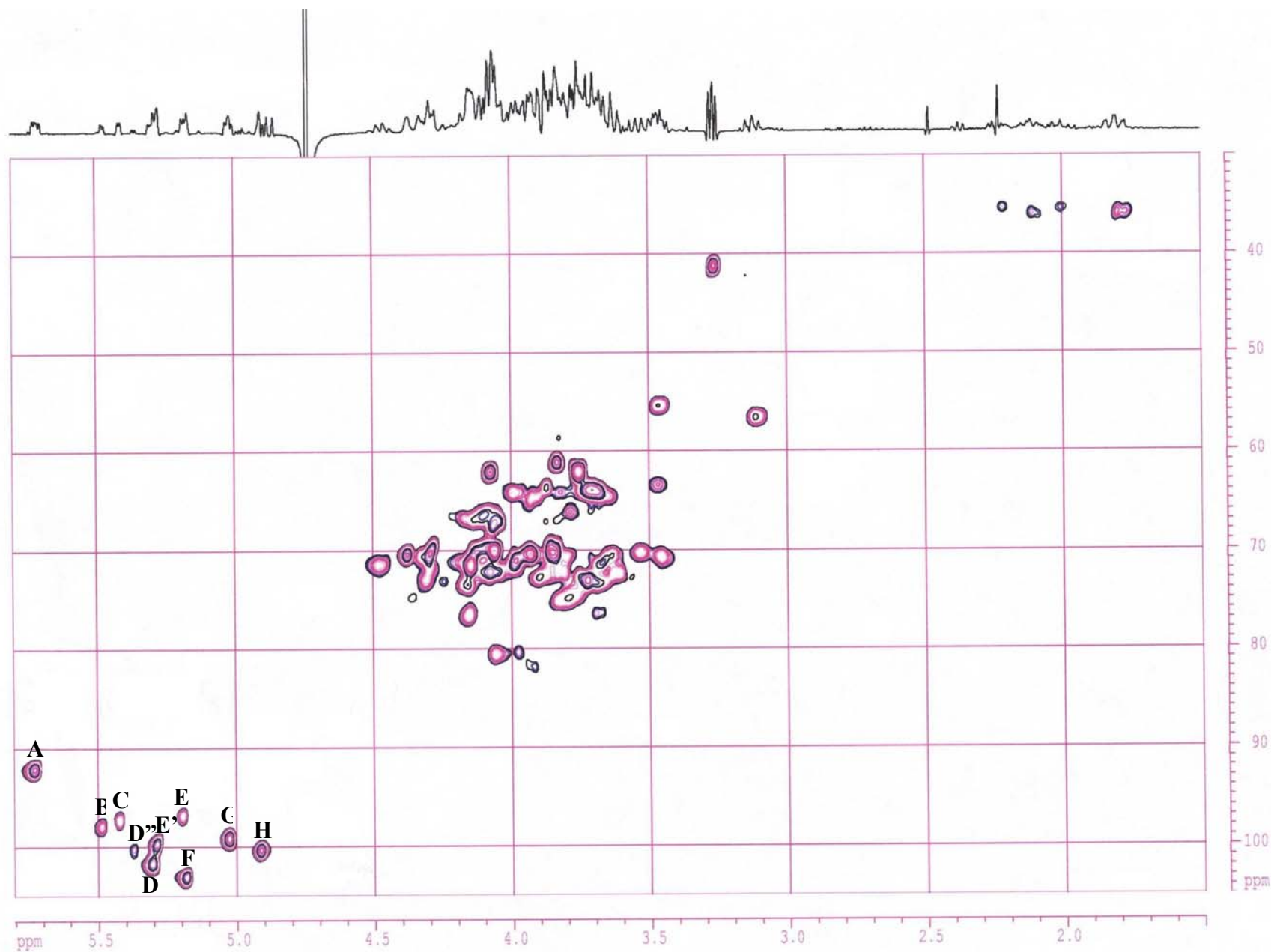


**Tabella 10:** Chemical shifts  $^1H$  and  $^{13}C$  NMR di OS1 e di OS2.

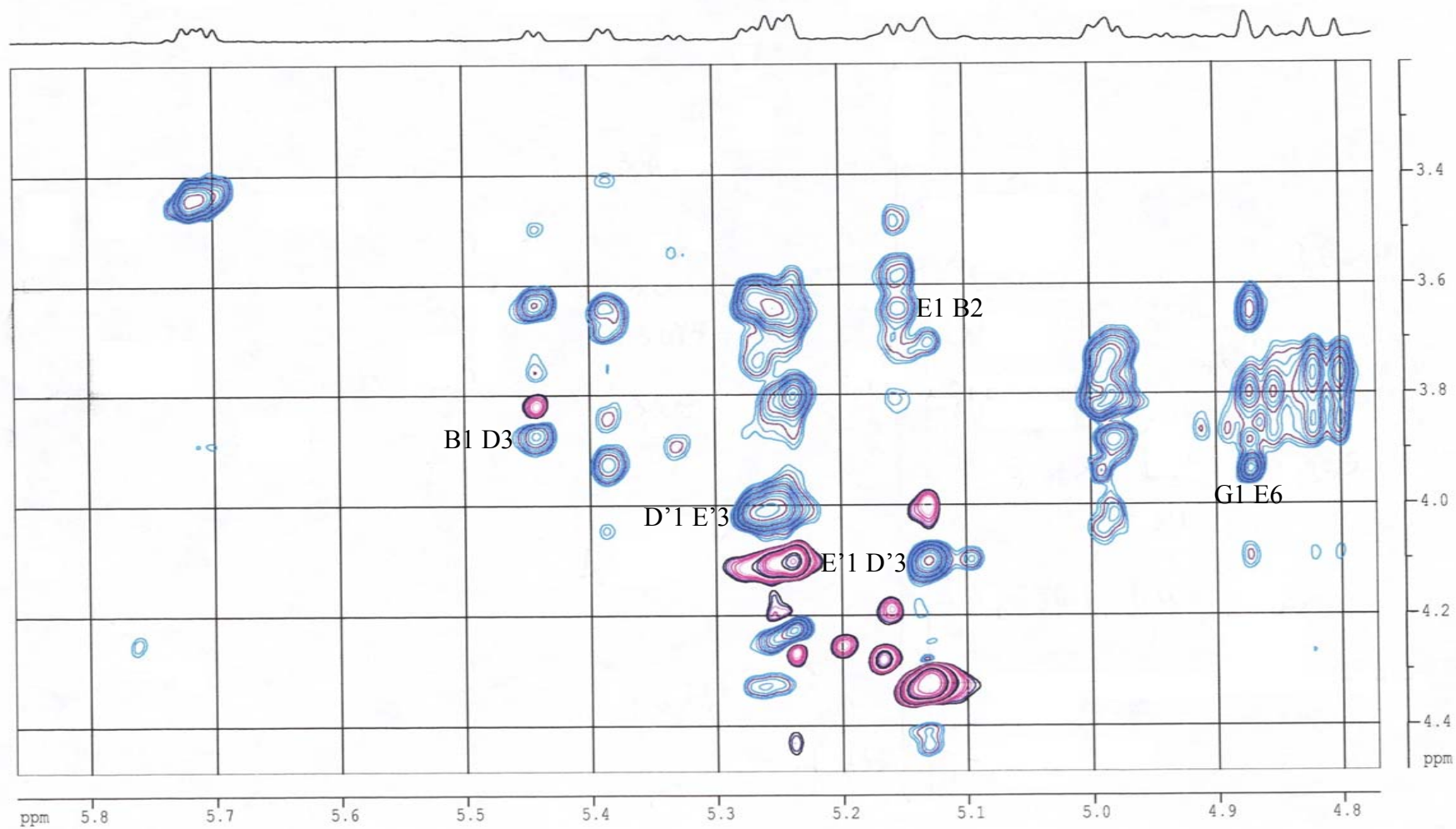
residuo		H1	H2/3ax	H3/3eq	H4	H5	H6a	H6b/7a	H7b/8a	H8b
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	
6- $\alpha$ -GlcN 1P	A	5.709	3.443	3.905	3.621	4.110	4.29	3.788		
		92.1	55.3	70.4	70.6	73.5	70.2			
2- $\alpha$ -Glc	B	5.47	3.669	3.808	3.516	4.058	3.83	3.90		
		97.8	76.5	71.5	70.2	72.2	61.2			
<i>t</i> - $\alpha$ -Glc	C	5.413	3.703	3.753	3.42	4.03	3.76	3.87		
		97.2	73.2		70.6					
3,6- $\alpha$ -Glc	D	5.292	3.650	3.88	3.76	4.127	4.06	3.77		
		101.7	71.2	81.9		71.6	66.2			
3,6- $\alpha$ -Glc	D'	5.276	3.687	3.92	3.83	4.11	4.08	3.52		
		101.7	72.0	81.9						
3- $\alpha$ -Hep 4P	D''	5.272	4.14	4.08	4.446	4.285		3.70		
		99.8	71.6	80.6	71.5	69.5		64.0		
6- $\alpha$ -Glc	E	5.174	3.592	3.726	3.491	4.115	3.91	3.67		
		96.8	72.4				65.8			
3- $\alpha$ -Hep	E'	5.161	4.367	4.05	3.71	3.98	4.08	3.83,3.78	3.91	
		103.1	70.3	80.6				70.2,70.6	70.4	
<i>t</i> - $\alpha$ -Gal	F	5.005	3.812	3.958	4.033	3.72	4.23	3.89	3.96	
		99.1	69.5	70.3	69.9	71.8				
<i>t</i> - $\alpha$ -Gal	F'	5.003	3.83	3.902	4.029	3.72	4.23	3.89	3.96	
		99.1								
<i>t</i> - $\alpha$ -Hep	G	4.892	3.968	3.81	3.84	3.588	4.014	3.701		
		100.3	70.4	71.5	67.2	70.5		64.0		
6- $\beta$ -GlcN 4P	H	4.87	3.09	3.85	3.68	3.74	3.42	3.85		
		100.3	56.5		76.4		63.4			
<i>t</i> -Kdo										
5-Kdo										
4,5-Kdo										
PEtn		4.05	3.26							
		62.2	41.4							

**Table 11:** *Dati ROESY per OSI e OS2.*

<b>Zucchero</b>	<b>Segnale NOE</b>		
	<b>Da</b>	<b>Intra-unità</b>	<b>Inter-unità</b>
A	A1	A2	
B	B1	B2	E1, D3
C	C1	C2	D'3
D	D1	D2, D4	E'3
D'	D'1	D'2	E'3
D''	D''1		Kdo5, Kdo7?(3.805)
E	E1	E2, E4	B1, B2
E'	E'1	E'4	D''3
F	F1	F2, F3	D6a, D6b
F'	F'1	F'2, F'3	D'6a
G	G1	G2, G3	E6a
H	H1	H3, H5	



**Figura34:** HSQC DEPT della frazione OS fosforilata in D<sub>2</sub>O a 400 MHz.



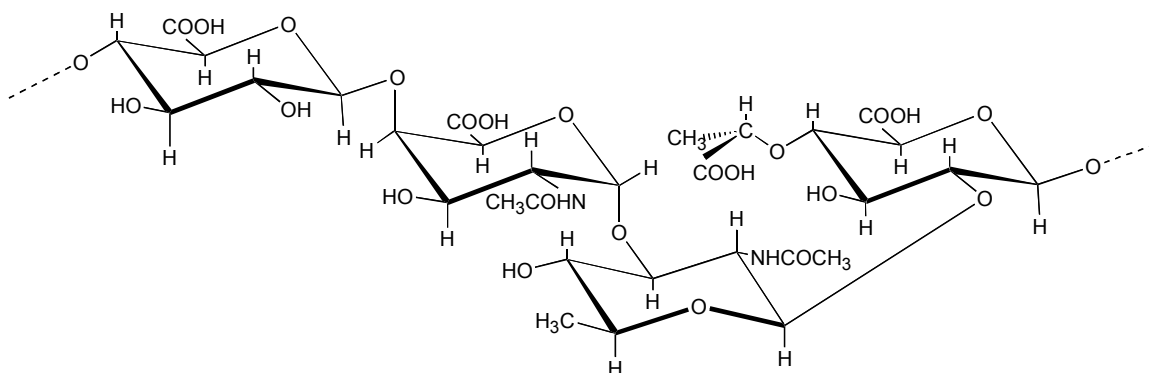
**Figura 35:** Spettro ROESY della frazione fosforilata in  $D_2O$  a 400 MHz.

## CONCLUSIONI

Oggetto della presente tesi di Dottorato è stato lo studio strutturale di lipopolisaccaridi prodotti da due batteri estremofili. In particolare sono stati studiati il batterio aloalcalofilo *Halomonas (Deleja) pantelleriensis* e un mutante del batterio psicrofilo *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125.

L'approccio sperimentale è consistito in uno stadio preliminare di estrazione e purificazione dell'LPS con metodi di precipitazione selettiva e metodi cromatografici, il secondo stadio ha previsto una delipidazione seguita dall'indagine strutturale sulla catena saccaridica. Quest'ultimo studio si è avvalso sia di tecniche spettroscopiche (GC-MS,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR 1D e 2D, MALDI-MS ed ESI-MS), che di metodi chimici degradativi.

Gli studi effettuati sul batterio *Halomonas pantelleriensis* sono stati tali da permettere la determinazione strutturale dell'unità ripetitiva della sua *O*-chain:



La caratteristica di tale *O*-chain è quella di possedere uno zucchero peculiare il 2- $\beta$ -[4-O-((*S*)-1-carbossietil)]-D-GlcpA mai ritrovato in nessun lipopolisaccaride.

Per quel che riguarda il secondo batterio in esame, le analisi effettuate sulla frazione lipooligosaccaridica del mutante di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 hanno messo in evidenza che questo è sostanzialmente diverso dal wild-type.

Le indagini preliminari hanno mostrato che il mutante produce un LOS, come il wild-type, ma le differenze che si riscontrano sono molteplici: in primo luogo è diversa la percentuale in peso di LOS ottenuta dalle cellule batteriche, infatti, nel mutante si riscontra una percentuale più alta (4.1%) di quella normale (1-3%), laddove nel wild-type essa è molto inferiore (0.8%); differenze sostanziali si riscontrano anche nella

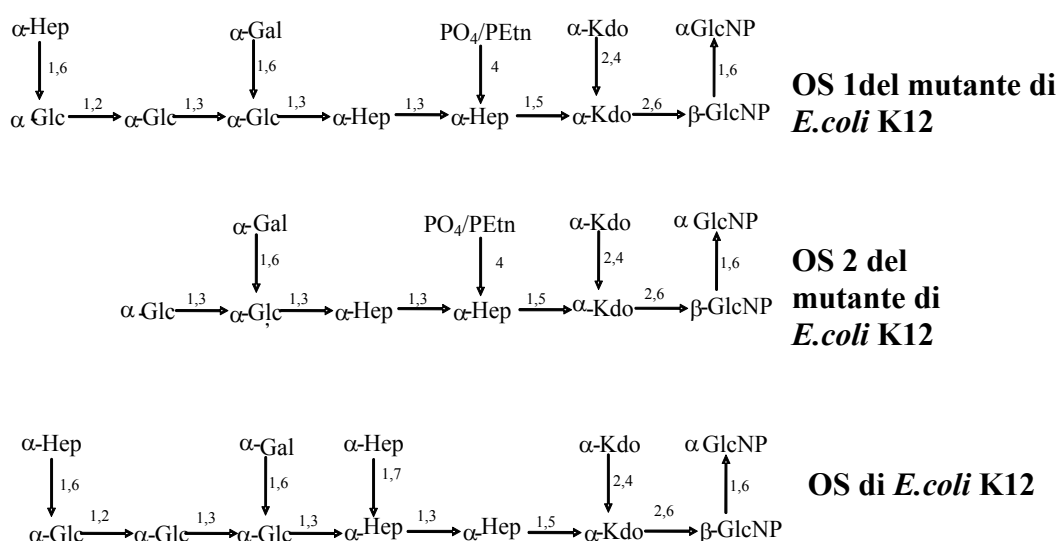
struttura del lipooligosaccaride, poiché è diversa la catena saccaridica sia per quanto riguarda la lunghezza che per la composizione, infatti nel mutante si riscontra la presenza di glucosio, assente nel wild-type, lì dove era presente la mannosammina.

Altra differenza sostanziale che si osserva è l'esistenza di numerosi gruppi fosfato presenti sul lipooligosaccaride del mutante (nel wild-type ne erano presenti solo tre), e, soprattutto, la presenza di fosfoetanolamina, assente totalmente nel wild-type.

L'LOS del batterio *P. haloplanktis* TAC 125 è costituito da due corte catene saccaridiche, che differiscono in un residuo di amminozucchero [15,19], invece quello del mutante è costituito da una miscela altamente complessa, così come è risultato dallo studio degli spettri MALDI e NMR.

In definitiva, confrontando le strutture dei due principali oligosaccaridi costituenti il core del mutante di *P. haloplanktis* TAC 125 con quella del core del wild type si è dedotto che i due batteri sono completamente diversi.

Piuttosto, alla luce dei risultati ottenuti dallo studio strutturale della frazione lipooligosaccaridica, è emerso che questo batterio presenta lo stesso core oligosaccaridico di *Escherichia Coli* K12 [46] a meno della presenza di un'unità di eptoso terminale e di un gruppo fosfato legato alla seconda unità di eptoso:



Questi risultati, insieme ad indagini di biologia molecolare, finalizzate all'identificazione del batterio in analisi, hanno permesso di confermare che esso fosse in realtà un mutante appartenente al ceppo di *E. Coli* K12 strain S17- $\lambda$ pir. Inoltre, da ulteriori indagini, è emerso che il gene *waaQ*, codificante l'enzima responsabile dell'inserimento dell'eptoso nella catena oligosaccaridica, risulta mutato.

Questo batterio, utilizzato per l'espressione di proteine, in esperimenti di coniugazione, è risultato essere un contaminante delle colture di *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125.

D'altra parte vi sono evidenze sperimentali che tale batterio presenta corpi di inclusione all'interno della cellula dovuti al non corretto folding delle proteine di membrana (Omp). È noto che gli LPS giocano un ruolo importante nel folding di tali proteine [46] suggerendo, quindi, per il nostro batterio, una correlazione tra i corpi di inclusione e la diversa struttura del LPS.

Allo stato attuale sono in corso esperimenti di complementazione volti all'ottenimento della corretta struttura del LPS allo scopo di verificare l'eventuale scomparsa dei corpi di inclusione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Woese et al. (1990), Herbert and Sharp (1992)
2. G.Aspinal in G. Aspinal (Ed), *The Polysaccharies*, (1983) 2, Academic Press, New York.
3. A. M. Glaubert, M. J. Thornley, *Annu. Rev. Microbiol.*, (1969) 23, 159; J.H. Freer, M. R. J. Salton in G. Weinbaum, S. Kadis, S. J. Ajl, *Microbial Toxins*. Vol. IV. Academy Press, New York (1971), Chapter 2.
4. Chatterjee, A. K. Vidaver, Ingramm, D. S., Williams, P. H., Eds., Academic Press, London, (1986) vol. 4, 94-114.
5. P. Bavoil, H. Nicaido and K. von Meyenburg, *Mol. Gen. Genet.*, (1977) 158, 23-33.
6. I. R. Beacham, D. Haas and E. Yagil, *J. Bacteriol.*, (1977) 129, 1034-1044.
7. J. F. Lutkenhaus, *J. Bacteriol.*, (1977) 131, 631-637.
8. Brade, H., Opal, S. M., Vogel, S. N., Morrison, D. C., Marcel Dekker Inc. (Eds.), New York Basel.
9. M. Vaara, *Microbio Re*, (1992) 56, 395-411.
10. U.Zahringer, B. Linder, E. T. Rietschel, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, (1994) 50, 211-276.
11. E.T.Rierschel, H. Brade, *Le Scienze*, (1992), 290).
12. R. Y. Marita, *Bacterial. Rev.* (1975), 39, 144-177.
13. Ono et al. al. (1999)
14. Ray, M. K., Kumar, G.S. & Shivaji, S. J. *Bacteriol.* (1994); 176; 4243
15. M.M.Corsaro, F.Dal Piaz, R.Lanzetta, M.Parrilli, J. Mass Spectrm in Press, (2002).
16. I. Romano, B.Nicolaus, L.Lama, M.C. Manca, A.Gambacorta :Syst. Appl. Microbial, (1996),19,326-333.
17. Martin et al. (1999)
18. Gelinski et al. (1985)
19. M.M. Corsaro, R. Lanzetta, E. Parrilli, M. Parrilli, M.L. Tutino *EurJ.Biochem.* 268, 5092 (2001)



20. C. Galanos, O. Luderitz & O. Westphal, *Eur. J. Biochem.*, (1969) 9, 245-249.
21. O. Westphal & K. Jann, *Methods Carbohydr. Chem.*, (1965) 5, 83-91.
22. Y. D. Karkhanis, J. Y. Zeltner, J. J. Jackson, D. J. Carlo, *Anal. Biochem.*, (1978) 85, 595-601.
23. K. J. Jhonson, *Meth. Carb. Cham.*, (1993) IX, 3-12.
24. N. Harada, K. Nakanishi, (1983). Oxford University Press.
25. K. Leontein, B. Lindberg & J. Lonngren, *Carbohydr. Res.*, (1978) 62, 359-362.
26. S. Hakomori, *J. Biochem.* (Tokyo), (1964) 205, 55
27. H. Bjorudal, C. G. Hellerquist, B. Lindberg, and S. Svensson, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, (1970) 9.
28. P. A. Sandford, H. E. Conrad, *Biochemistry*, (1966) 5, 1508-1517.
29. I. Ciucanu & F. Kerek, *Carbohydr. Res.*, (1984) 131, 209-217.
30. L. S. Forsberg, U. Ramadas Bhat & R. W. Carlson, *J. Biol. Chem.*, (2000) 175, 18851-18863.
31. H. Bjorudal, C. G. Hellerquist, B. Linberg, S. Svensson, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, (1970) 9, 610.
32. T. J. Waeghe, A. G. Darvill, M. Mcnei, and Albersheim, *Carb. Res.*, (1983) 123, 281.
33. P. E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg, and J. Lonngren, *Chem. Commun.*, (1976) 8, 1.
34. S. H. Doares, P. Albersheim and A. G. Darvill, *Carb. Res.*, (1991) 210, 311.
35. D. P. Sweet, R. Shapiro and P. Albersheim, *Carb. Res.*, (1975) 40, 217.
36. Mock, K. K., Sutton, C. W., Cottrell, J. S., *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, (1992), 6, 233.
37. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wang, S. F., Whitehouse, C. M., *Science*, (1989), 246, 64.
38. Mann, M., Meng, C. K., Fenn, J. B., *Anal. Chem.*, (1989), 61, 1702.
39. Muck, A., Ramm, M. & Hamburger, M. (1999) *J. Chromatogr. B* 732, 39-46.
40. Galemme, R.A. & Horton, D.Jr. (1983) Preparative routes to methyl 2-acetamido-2,6-dideoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside. *Carbohydr. Res.* 119, 231-240.

41. Lipkind, G.M., Shashkov, A.S., Knirel, Y.A., Vinogradov, E.V. & Kochetkov, N.K. (1988) *Carbohydr. Res.* 175, 59-75
42. Shashkov, A.S., Lipkind, G.M., Knirel, Y.A. & Kochetkov, N.K. (1988) *Mag. Res. Chem.* 26, 735-747.
43. Parolis, L.A.S., Parolis, H., Niemann, H. & Stirm, S. (1988) *Carbohydr. Res.* 179, 301-314.
44. L. Birolo, M. L. Tutino, B. Fontanella, C. Gerday, K. Mainolfi, S. Pascarella, G. Sannia, F. Vinci & G. Marino, *Eur. J. Biochem.*, (2000) 267, 2790-2802.
45. O. Holst, (O. Holst, ed.), (2000) 145, 345-353. Humana Press, Totowa, NJ.
46. S. Muller-Loennies, B.Lindner, H. Brade *J.Biol.Chem.* 278, 34090-34101 (2003).